



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUCAS HENRIQUE MONTES BOMFIM

EFEITO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA PIRUVATO CARBOXILASE NO
METABOLISMO, NA FUNÇÃO MITOCONDRIAL E NA RESPOSTA À INSULINA EM
CÉLULAS MUSCULARES

CAMPINAS

2017

LUCAS HENRIQUE MONTES BOMFIM

EFEITO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA PIRUVATO CARBOXILASE NO
METABOLISMO, NA FUNÇÃO MITOCONDRIAL E NA RESPOSTA À INSULINA EM
CÉLULAS MUSCULARES

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para obtenção do título de mestre em Biologia
Funcional e Molecular, na Área de
Bioquímica.

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELO ALUNO LUCAS HENRIQUE MONTES BOMFIM
E ORIENTADA PELO PROF.DR. LEONARDO DOS REIS SILVEIRA

Orientador: LEONARDO REIS SILVEIRA

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

Bomfim, Lucas Henrique Montes, 1993-B639e
Efeito da expressão da enzima piruvato carboxilase no metabolismo, na função mitocondrial e na resposta à insulina em células musculares / Lucas Henrique Montes Bomfim. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Leonardo dos Reis Silveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Piruvato carboxilase. 2. Musculo esquelético. 3. Células musculares. 4. Resistência à insulina. I. Silveira, Leonardo dos Reis, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of pyruvate carboxylase overexpression on mitochondrial function, mitochondrial biogenesis and insulin response in muscle cells

Palavras-chave em inglês:

Pyruvate carboxylase

Skeletal muscle

Muscle cells

Insulin resistance

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Leonardo dos Reis Silveira [Orientador]

Sandro Massao Hirabara

Marcio Alberto Torsoni

Data de defesa: 17-03-2017

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 17 de março de 2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira

Prof. Dr. Sandro Massao Hirabara

Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

RESUMO

A resistência à insulina é uma das principais características em indivíduos diabéticos tipo 2. Embora o número de pesquisas tenha crescido, o mecanismo de instalação dessa patologia ainda não é totalmente conhecido. Porém, atualmente há forte correlação entre resistência à insulina, ganho de peso, inatividade e elevada produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio. Recentemente, estudos mostraram que a superexpressão da proteína anaplerótica fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK) no tecido muscular de camundongos protege esses animais da obesidade, aumenta o metabolismo basal, o consumo de lipídeos intracelular, a capacidade física e a longevidade. Baseado no fenótipo desses animais, nossa proposta foi examinar o efeito da elevada expressão da proteína piruvato carboxilase (PC), uma enzima anaplerótica importante do tecido muscular, na função do ciclo do ácido tricarboxílico, na expressão do PGC1 α , no consumo de oxigênio e no metabolismo de lipídeo e de glicose de células musculares. Nossa hipótese é que a redução da função do ciclo do ácido tricarboxílico possa favorecer a dissociação entre a β -oxidação dos ácidos graxos e a atividade da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Para testar essa hipótese, superexpressamos a proteína PC em células musculares controles e resistentes à insulina e examinamos o efeito dessa manipulação no metabolismo, na função mitocondrial, biogênese mitocondrial e resposta à insulina. Os resultados demonstraram que a superexpressão da PC em células musculares foi acompanhada da maior expressão de genes oxidativos, intermediários do ciclo de Krebs, aumento de NAD⁺ e diminuição da razão NADH/NAD⁺, aumento da fosforilação de AMPK e da função oxidativa, sugerindo que esta enzima pode ser um importante alvo terapêutico no combate a doenças metabólicas, principalmente o diabetes tipo 2.

ABSTRACT

Insulin resistance is the major feature in diabetic individuals. Although the number of researches have markedly increased, the molecular mechanism behind this disease remains unclear. However, there is consensus demonstrating a strong correlation among insulin resistance, weight gain and low mitochondrial activity in peripheral tissues. Recently, studies have shown that overexpression of PEPCK enzyme in the skeletal muscle of mice protected these animals of obesity, increased basal metabolism, intracellular lipids consumption, physical capacity and longevity. Based on the phenotype of these animals, our proposal was to examine the effect of the pyruvate carboxylase (PC) overexpression, an important anaplerotic enzyme, on mitochondrial biogenesis process, function of the tricarboxylic acid cycle, mitochondrial function; lipid and glucose metabolism, and insulin response in skeletal muscle cells. Our hypothesis is that elevated anaplerosis and/or reduced intracellular acetyl-CoA content might protected the cells against the mechanism of insulin resistance increasing mitochondrial function and biogenesis. To test this hypothesis, we overexpressed PC in control and insulin resistant C2C12 cells and examined the effect of this manipulation over the metabolism, mitochondrial function, mitochondrial biogenesis and in the insulin response. Our findings demonstrated that overexpression of PC was consistent with increased expression of oxidative genes, Krebs cycle intermediates and mitochondrial respiration, decreased NADH/NAD⁺ ratio, higher AMPK phosphorylation and oxidative function, suggesting that this enzyme might be an important therapeutic target against metabolic diseases, especially diabetes type 2 in skeletal muscle cells.

1. INTRODUÇÃO	4
1.2. OBJETIVO.....	10
1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
2. MATERIAIS E MÉTODOS	11
2.1. Isolamento e cultivo de células	11
2.1.1. Cultivo de células primárias de músculo esquelético.....	11
2.1.2. Cultivo de células musculares C2C12	11
2.1.3. Cultivo de células HEK 293T.....	11
2.1.4. Cultivo de células INS	12
2.2. Grupos experimentais.....	12
2.2.1 – Células musculares C2C12 e primárias	13
2.2.2 – Grupo de animais.....	13
2.2.3 – Células HEK 273T	13
2.2.4. – Células INS e ilhotas isoladas	13
2.3. Indução da resistência à insulina com ácido graxo	13
2.4. Transfecção e inibição.....	13
2.4.1. Seleção de células musculares C2C12 transfectadas.....	14
2.5. Western Blotting	15
2.6. Determinação da concentração de proteínas totais	16
2.7. Reação de transcrição reversa (RT)	16
2.7.1 Expressão gênica (mRNA)	16
2.8. Reação de PCR em tempo real (RT-PCR)	17
2.9. Biogênese mitocondrial.....	18
2.10. Consumo de oxigênio.....	18
2.11. Reações Bioquímicas	18
2.11.1. Determinação de lactato no meio de cultura	18
2.11.2. Determinação de NADH de células musculares C2C12	18
2.11.3. Determinação de NAD ⁺ de células musculares C2C12.....	19
2.11.4. Determinação dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) em células musculares C2C12 e HEK 293T	19
2.11.5. Captação de glicose em células musculares C2C12.....	20
2.12. Inibição farmacológica da piruvato carboxilase em C2C12	20
2.13. Ensaio de imunofluorescência para detecção da piruvato carboxilase e mitocôndrias utilizando mitotracker	20
2.14. Secreção de insulina estimulada por glicose	21
2.15. Modelo de caracterização animal.....	21
2.16. Análise estatística.....	22

3. RESULTADOS	23
3.1. Relação entre PGC1- α e piruvato carboxilase em diferentes tecidos	23
3.2. Transfecção em células HEK 293T	24
3.3. Efeito da superexpressão de PC na indução de genes oxidativos em células HEK ..	25
3.4. Efeito da superexpressão de PC nas concentrações de lactato e de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico em células HEK 293T	25
3.5. Transfecção em células musculares C2C12	27
3.6. Efeito da superexpressão da PC na indução de genes oxidativos em células C2C12 e na reversão do quadro de resistência à insulina em cultura primária de células musculares	28
3.7. Efeito da inibição farmacológica da PC nas concentrações de lactato e intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico em células musculares C2C12	30
3.8. Transfecção da piruvato carboxilase em células primárias de músculo de rato Wistar	31
3.9. Superexpressão da piruvato carboxilase reverte o quadro de resistência à insulina e disfunção mitocondrial provocada pela exposição à ácido palmítico, assim como aumenta o conteúdo de HIF 1 α	32
3.10. Inibição da piruvato carboxilase reduz a liberação de insulina em ilhotas β -pancreáticas e reduz genes oxidativos.....	34
3.11. Efeito da superexpressão da enzima piruvato carboxilase na produção de NAD ⁺ e NADH em células musculares C2C12	35
3.12. Efeito da superexpressão da enzima piruvato carboxilase na concentração de malato citosólico e mitocondrial em células musculares C2C12.....	36
3.13. Efeito da inibição do transportador de malato na produção de NAD ⁺ e NADH.....	37
3.14. Efeito da inibição do transportador de malato na produção de malato na fração citosólica e mitocondrial de células musculares C2C12	38
3.15. Efeito da superexpressão da enzima piruvato carboxilase na fosforilação de AMPK	38
3.16. Efeito da superexpressão da PC no conteúdo da proteína SIRT 3	39
3.17. Efeito da superexpressão da PC no consumo de oxigênio de células musculares C2C12	40
3.18. Tratamento com galactose e <i>shift</i> metabólico em células musculares C2C12.....	40
4. DISCUSSÃO	43
5. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
Anexo I. Comitê de ética do projeto	57
Anexo II. Declaração direitos autorais	58

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de diversas doenças metabólicas incluindo o diabetes tipo 2 está diretamente associado ao estilo de vida adotado pelos indivíduos. Claramente, há estrita relação entre obesidade, sedentarismo e o desenvolvimento do diabetes tipo 2. Essa relação é preocupante, pois o número de indivíduos sedentários e obesos cresce acentuadamente ao longo das últimas décadas, favorecendo a incidência do diabetes na população mundial. A Organização Mundial de Saúde destaca que a obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo atual, sendo o quinto fator de risco de morte, com cerca de 2,8 milhões de óbitos anualmente. Mais alarmante, estudos atuais indicam que o número de indivíduos acometidos por esta doença poderá duplicar até 2030 em todo território mundial (WILD et al. 2014). Atualmente, existem fortes evidências de que o mecanismo de instalação da resistência à insulina está associado ao acúmulo de triacilglicerol intracelular, à disfunção mitocondrial e à produção de espécies reativas de oxigênio (BARBOSA, et al 2013, SZENDROEDI et al. 2012, PETERSEN et AL., 2003, SHULMAN et al., 2005). A reprodutibilidade deste quadro tem sido facilmente induzida em animais submetidos à dieta hiperlipídica (HOEHN et al., 2010) e também em células de tecidos periféricos isoladas expostas a altas concentrações de glicose e ácidos graxos saturados (HIRABARA et al., 2007).

O exercício físico reduz os níveis de lipídeos intracelulares que são oxidados pela beta oxidação e, atualmente, é considerado uma das formas mais eficientes no controle do diabetes tipo 2 e obesidade. De fato, Holloszy et al (2015) foram capazes de observar, em ratos Zucker, que uma única sessão de contração muscular é capaz de reverter o quadro de resistência à insulina. Recentemente, demonstramos que a captação de glicose em células musculares, previamente tratadas com ácido palmítico, é substancialmente reduzida. Porém, quando submetidas à contração muscular ou expostas ao desacoplamento mitocondrial químico, essas células recuperaram a sua capacidade de captar glicose, exibindo valores na mesma magnitude das células controles. Esses achados fortalecem o conceito de que a sobrecarga de nutrientes mitocondrial pode ser um dos principais indutores da resistência à insulina nos tecidos periféricos; e que, sabidamente, o exercício agudo não é capaz de induzir as adaptações, como é o caso do aumento de biogênese mitocondrial. Em adição, nosso grupo demonstrou que existe forte dissociação entre o ciclo do ácido tricarboxílico e a beta oxidação dos ácidos graxos no tecido muscular. Este fato é evidenciado pela redução na captação de glicose acompanhada da baixa expressão do PGC1- α em células resistentes à insulina. Com

reduzida atividade do ciclo do ácido tricarboxílico, a oxidação da molécula de acetil-CoA proveniente da beta oxidação fica prejudicada, favorecendo seu acúmulo mitocondrial (KOVES, et al., 2008). Mais interessante, os tecidos periféricos de animais obesos/diabéticos apresentam reduzida expressão de um amplo conjunto de genes associados ao metabolismo celular de glicose e ácidos graxos, ao programa gênico de biogênese mitocondrial e à função mitocondrial, indicando que a busca de genes alvos para atenuar/inibir esse quadro possa constituir importante estratégia terapêutica contra a resistência à insulina. Hakimi et al. (2007) demonstraram que a superexpressão da enzima anaplerótica fosfoenol piruvato carboxiquinase citosólica (PEPCK-c) no músculo esquelético de ratos promove evidentes alterações fenotípicas nesses animais, incluindo a diminuição da massa adiposa, aumento do número de mitocôndrias, maior consumo de oxigênio basal, aumento na capacidade de corrida e redução do lactato sanguíneo. Essas alterações foram consistentes com a nossa hipótese, mostrando que a elevada atividade anaplerótica provocaria melhor resposta metabólica à glicose, lipídeos e também nas concentrações de leptina e insulina plasmáticas o que levaria, por consequência, aumento na longevidade.

O desenvolvimento da resistência à insulina no musculo esquelético ainda não é totalmente esclarecido e seus mecanismos bioquímicos ainda estão sendo estudados. Contudo, Randle et al. (1963) foram os primeiros a demonstrarem que sob elevada exposição de ácidos graxos a utilização da glicose é substancialmente reduzida no musculo esquelético. Esse mecanismo foi denominado de ciclo glicose-ácido graxo e é sustentado como uma das possíveis explicações do mecanismo de instalação da resistência à insulina. Quando há oferta elevada de nutrientes (ácido palmítico por exemplo) ocorre elevada razão das concentrações de acetil-CoA nas células, como consequência da elevada oxidação de lipídeos e aumento no conteúdo intracelular de citrato e glicose 6 fosfato. O acetil CoA em excesso é um potente inibidor da enzima piruvato desidrogenase (PDH), via ativação da PDH kinase – enzima responsável pela fosforilação e inativação do complexo PDH – fazendo com que, assim, ocorra redução da oferta de glicose como substrato oxidativo. O conteúdo elevado de citrato, ainda, faz com que a proteína fosfofrutoquinase (PFK) também seja inibida, reduzindo ainda mais a entrada da glicose na célula muscular. Apesar de os mecanismos de indução da resistência à insulina e diabetes do tipo 2 ainda não serem esclarecidos, nosso grupo tem observado que o acúmulo de acetil CoA e a formação de espécies reativas de oxigênio são os grandes responsáveis por essa disfunção mitocondrial. Essa disfunção mitocondrial é acompanhada pela redução da fosforilação da Akt, de genes mitocondriais, consumo de oxigênio e intermediários do ciclo de Krebs.

A relação existente entre anaplerose do ciclo do ácido tricarboxílico e o aumento na função mitocondrial sugere que a manipulação de genes anapleróticos possa constituir importante estratégia terapêutica contra o desenvolvimento da disfunção mitocondrial e da resistência à insulina no tecido muscular. Gibala et al (2003) demonstraram que, após um programa de treinamento aeróbio, conhecida condição de aumento da função mitocondrial, os animais mostram aumento de intermediários do ciclo de Krebs. Shulman et al. (2008) demonstraram que o aumento no consumo de oxigênio no tecido muscular em indivíduos treinados foi consistente com a expansão do ciclo do ácido tricarboxílico. No entanto, existem vários mecanismos que contribuem para a formação de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (ICAT). Shalin (1990) demonstrou, através da técnica de biópsia muscular em humanos, que durante o exercício físico no ciclo-ergômetro, a 70% do VO₂ máximo, ocorre a expansão do *pool* (soma da concentração) de substratos do ciclo do ácido tricarboxílico após 5 minutos iniciais de exercício. Embora ainda haja muita controvérsia, a expansão das concentrações dos ICAT no exercício físico é atribuída à reação catalisada pela enzima alanina aminotransferase (AAT) (GIBALA et al., 1997). A formação de piruvato pela glicólise excede a taxa de oxidação pelo ciclo do ácido tricarboxílico durante a fase inicial do exercício e, por se tratar de uma reação de equilíbrio, há favorecimento na formação de α -cetoglutarato e, conseqüentemente, da expansão do ciclo do ácido tricarboxílico (BANGSBO et al., 2006). Outras reações anapleróticas de aumento nas concentrações de ICATs no tecido muscular são as reações catalisadas pelas enzimas: málica (EM), piruvato carboxilase (PC), fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK), aspartato aminotransferase (Asp-AT) e glutamato piruvato transaminase (GPT), sugerindo a glicose como o principal substrato anaplerótico. A relação entre glicose e atividade anaplerótica no tecido muscular é suportada pelas observações de que a expansão do CAT é comprometida em pacientes com deficiência da enzima glicogênio-fosforilase (doença de McArdle) e pelo fato da concentração de ICAT diminuir com a atividade muscular prolongada, causando redução do conteúdo de glicogênio muscular e hepático (SAHLIN et al., 1990). Porém, outras vias não dependentes de carboidratos podem ser importantes na manutenção do fluxo de substratos pelo ciclo do ácido tricarboxílico. Entre essas vias estão o ciclo das purinas e as reações catalisadas pelas enzimas GDH (glutamato desidrogenase) e BCOAD (2-oxoácido desidrogenase de cadeia ramificada). Sendo assim, estratégias de aumento na disponibilidade de piruvato para o ciclo do ácido tricarboxílico podem ser decisivas para o maior fluxo de intermediários e, conseqüentemente, em elevar a produção de energia.

Recentemente, observamos em cultura de células musculares expostas ao ácido palmítico ou ao mimético de AMPK (AICAR) que a transcrição de genes anapleróticos e o

conteúdo dos ICAT acompanha a função mitocondrial. Quando tratamos as células com AICAR, observamos aumento da função mitocondrial, anaplerose do ciclo de Krebs e aumento na transcrição das enzimas anapleróticas. O contrário também foi observado quando tratamos as células com ácido palmítico, demonstrando que a anaplerose do ciclo do ácido tricarboxílico acompanha a função mitocondrial, como é possível observar na figura 2, extraída do trabalho de conclusão de curso (BOMFIM L.H.M, 2014).

Tendo em vista a contribuição importante dessas proteínas na função mitocondrial de células musculares e na anaplerose do ciclo de Krebs, seria lógico sugerir que a manutenção da transcrição elevada de proteínas anapleróticas pudesse proteger o tecido muscular da resistência a ação da insulina. A proteína piruvato carboxilase (PC), foco de nosso estudo, está envolvida na gliconeogênese no fígado, em processos metabólicos no rim e no tecido adiposo branco e marrom. Entretanto, sua função no tecido muscular e os efeitos da manipulação desta enzima neste tecido ainda permanecem obscuros. Há poucas descrições na literatura relacionando a piruvato carboxilase com o tecido muscular. Minet e Gaster (2010) comprovaram a existência da enzima piruvato carboxilase em músculo esquelético através de biópsias do tecido de humanos, mas não há relatos sobre a função.

Realizamos, por intermédio do software “Genevestigator”, análise de bioinformática, em que é possível filtrar os estudos publicados na literatura com o nosso gene de interesse. Ao pesquisarmos PCX (gene da Piruvato Carboxilase) expresso em músculo esquelético, observamos que os estudos que apresentam atividade mitocondrial elevada, como por exemplo o tratamento com Rosiglitazona e miogênese, apresentam também aumento na expressão da PC (*up regulation*). Por outro lado, estudos em que a atividade mitocondrial e função mitocondrial estão baixas, como por exemplo inibição do PPAR gamma, a PC também está mais reduzida (*down regulada*). Em adição a esses achados, é possível observar aumento na expressão da PC em músculo esquelético durante o desenvolvimento do animal, conforme demonstrado na figura 1, painéis A e B, respectivamente. Esses dados são sugestivos de que a PC possa ter importante função no metabolismo mitocondrial e no desenvolvimento celular em músculo esquelético.

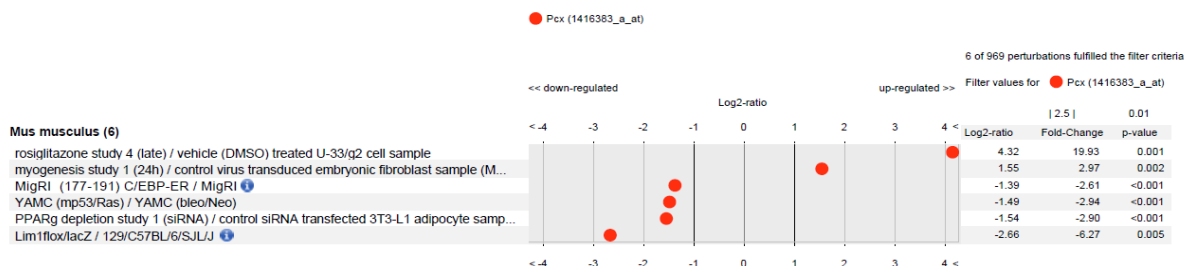
Sabe-se que a mitocôndria participa de processos celulares cruciais, como a produção de energia e metabolismo. Embora mitocôndrias possuam seu próprio genoma - um vestígio de suas origens bacterianas e evolução - as proteínas mitocondriais são codificadas no núcleo. A expressão proteica mitocondrial, portanto, exige uma coordenação fina e de crucial importância quando as células são expostas a diferentes tipos de estresses e condições metabólicas, como exercício físico e resistência à insulina. Pedro et al. Publicaram, em 2016, um artigo de revisão mostrando a relação entre as vias de coordenação e comunicação entre o

núcleo e a mitocôndria no processo de homeostase metabólica. Essa comunicação foi definida como sinalização “retrógrada”, a sinalização entre mitocôndria e núcleo. Esse pode ser um importante mecanismo para explicar fenômenos que ocorrem no músculo esquelético, como por exemplo a mudança de fenótipo. Em nosso estudo estamos propondo que a PC possa ser a responsável pela sinalização retrógrada entre mitocôndria e núcleo; para isso, analisamos o conteúdo proteico de AMPK, Sirtuinas, intermediários do ciclo de Krebs e a análise de diversos genes mitocondriais. Foi analisado, também, a expressão de PGC1- α que, ao migrar para o núcleo, promove a transcrição de diversos genes que melhoraram a função mitocondrial.

Para estudar esses efeitos, superexpressamos a enzima PC e verificamos se seu aumento em células musculares pode favorecer a melhora da função mitocondrial, o processo de biogênese mitocondrial e a resposta à insulina. Se nossa hipótese for verdadeira, a superexpressão da proteína PC pode constituir-se uma estratégia importante de proteção contra a resistência à insulina no tecido muscular, abrindo novas perspectivas terapêuticas no controle do diabetes tipo 2 e diversas doenças metabólicas.

A.

Dataset: 6 perturbations from data selection: MM_AFFY_430_2-0
1 transcript from gene selection: MM-0



B.

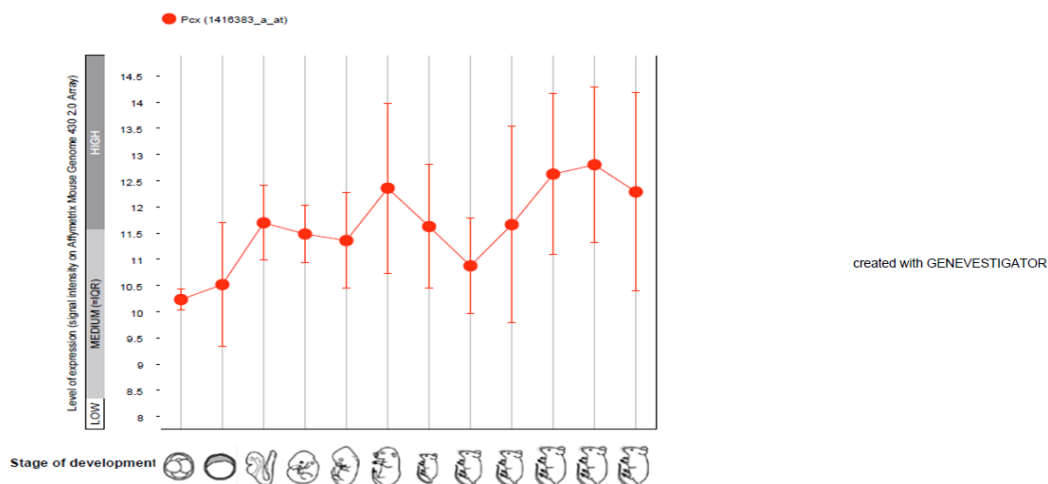


Figura 1. Análise de bioinformática do gene da piruvato carboxilase (PCX) em músculo esquelético, o painel A mostra os estudos em que a PC está mais expressa e menos expressa. O painel B mostra a expressão da PC durante o desenvolvimento embrionário. $P < 0,001$.

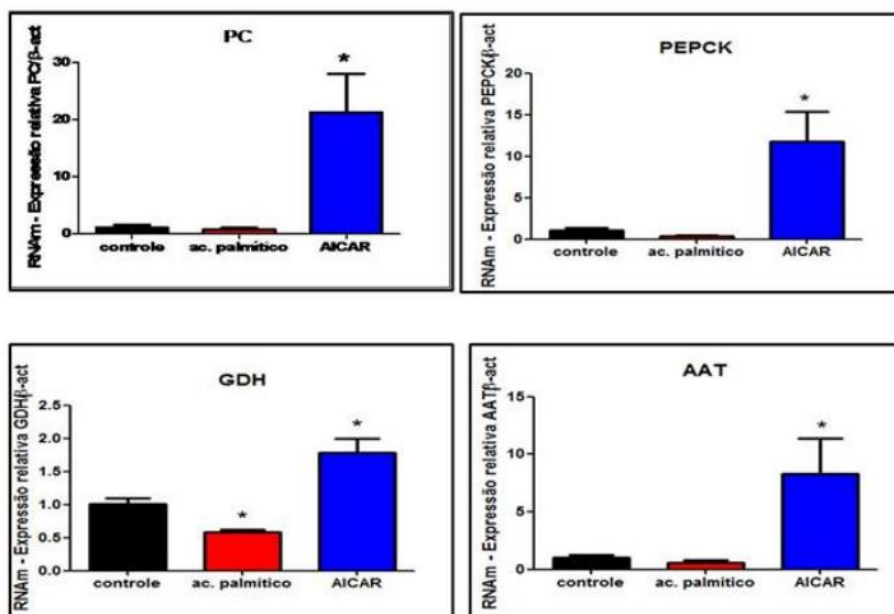


Figura 2. Expressão relativa dos genes: Piruvato Carboxilase (PC), Fosfoenol Piruvato Carboxiquinase (PEPCK), Glutamato Desidrogenase (GDH) e Alanina Amino Transferase (AAT), em células musculares de cultura primária tratadas com ácido palmítico (500 μ M) e AICAR (250 μ M). Normalizados pela beta actina. (n=6) * $p < 0,05$ comparados ao controle. (BOMFIM, L.H.M. 2014)

1.2 . OBJETIVO

Investigar o efeito da superexpressão da enzima piruvato carboxilase (PC) no metabolismo mitocondrial e no processo de biogênese mitocondrial em células musculares de cultura primária, C2C12, HEK 293 T e INS, controle e resistentes à insulina.

1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito da elevada expressão da piruvato carboxilase (PC) sobre genes relacionados ao metabolismo, como PGC1 α e TFAM, em células musculares C2C12;
- Examinar os efeitos da elevada expressão e da inibição da PC sobre o conteúdo dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico em células musculares C2C12 e HEK293T;
- Verificar os efeitos da elevada expressão da PC sobre o consumo de oxigênio de células musculares C2C12;
- Verificar a relação entre biogênese mitocondrial (expressão de PGC1 α) e relacionar com a expressão da PC em células musculares de ratos e também em diferentes tecidos de camundongos C57 bl6;
- Verificar o efeito da superexpressão da PC na fosforilação de AMPK e sobre o conteúdo de PGC1 α em células C2C12.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Isolamento e cultivo de células

2.1.1. Cultivo de células primárias de músculo esquelético

As células musculares foram obtidas a partir dos músculos quadríceps, isquiostibiais, tibial anterior, extensor digital longo (EDL), sóleo e gastrocnêmio de ratos wistar singenéticos jovens e recém-desmamados (4 semanas). O material biológico foi extraído com o auxílio de instrumentação cirúrgica esterilizada. Em seguida, foi colocado em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (sem soro) e homogeneizado. O homogenato foi digerido em solução contendo collagenase a 2 %, durante 90 minutos, a 37 °C. Em seguida, passou por outra digestão em solução contendo collagenase a 2,5 %, tripsina 2,5 % e DNase 0,1 %, durante 30 minutos, a 37 °C. O homogenato foi centrifugado a 1000 g, por 20 minutos, a 4 °C e, em seguida, 15 mL de DMEM (com soro fetal bovino a 10 %) foram adicionados a solução para neutralização da tripsina. A solução foi centrifugada (1000 g) por 20 min, a 4 °C e o sobrenadante descartado. O material foi ressuspensionado em meio DMEM contendo soro fetal bovino a 10 %, L-glutamina a 4 mM, antibiótico a 1 % e pH de 7,3. As células foram plaqueadas e a população foi expandida em garrafas de cultivo celular, mantidas a 37°C em estufa úmida na presença de 95 % de O₂ e 5 % de CO₂. A troca do meio foi realizada a cada 24 h até atingir confluência de 80 %.

2.1.2. Cultivo de células musculares C2C12

As células imortalizadas C2C12 foram descongeladas, centrifugadas a 1000 g e ressuspensionadas em 5 mL de meio DMEM (10% soro fetal bovino) e plaqueadas em garrafas de 75 cm². Após atingir a confluência de aproximadamente 70%, as células foram tripsinizadas (1% tripsina) por 3 minutos a 37°C e centrifugadas a 1000 g. Após isso, foram ressuspensionadas em 1 mL e contadas por meio da câmara de *neubauer*. Após a contagem, 200 mil células foram plaqueadas em placas de 6 *wells* em meio DMEM (10% soro fetal bovino) e, após atingir a confluência de aproximadamente 70%, foi adicionado DMEM (2% soro de cavalo) durante 4 dias para induzir a diferenciação; após este período, os experimentos foram realizados.

2.1.3. Cultivo de células HEK 293T

As células de embrião de rim humano (Human Embryonic Kidney 293t), também chamadas de HEK 293t, foram cultivadas, destacando-se por sua facilidade de transfecção e manipulação gênica. A análise da transfecção da piruvato carboxilase nesse modelo pode ser indicativo da resposta ao fluxo metabólico, visto que essas células possuem característica mais glicolítica que oxidativa (Henry, O. et al., 2010). As células HEK 293 T foram descongeladas em temperatura ambiente. Após o descongelamento, as células foram centrifugadas a 1000 g, 25 °C por 5 minutos. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 15 mL de meio DMEM (10% soro fetal bovino) e plaqueadas em garrafas de 75 cm². As células foram incubadas na estufa de CO₂ (5%) 37 °C até atingirem a confluência de 90 %. Após isso, foi adicionado 1 mL de tripsina (1 %) e incubado por 3 minutos 37 °C. Em seguida, as células foram ressuspensas da placa utilizando-se 5 mL de meio DMEM (10 % soro fetal bovino) e centrifugadas 1000 g 25 °C. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio DMEM (10 % soro fetal bovino) e contadas em *câmara de Neubauer*. Foi plaqueado o total de 200 mil células em placas de 6 *wells*, em meio DMEM (10 % soro fetal bovino).

2.1.4. Cultivo de células INS

Para ratificar a importância da Piruvato Carboxilase em diferentes tecidos e tipos celulares e sabendo que há forte relação entre função mitocondrial e secreção de insulina, foram realizados testes para verificar a importância da PC no processo de secreção em células INS. As células foram mantidas em placas de cultura estéril (Falcon), contendo meio GI 1640 (Sigma, St. Louis, USA), acrescido de 11 mM de glicose, 2,5% de soro fetal bovino (FBS), 10 mM de Hepes, 1 mM de piruvato, 50 µM de Beta mercapto e 100 U/mL de Penicilina (Sigma, St Louis, USA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma, St. Louis, USA), em atmosfera umedecida, contendo 5 % CO₂, à temperatura constante de 37 °C.

Quinhentas mil células foram cultivadas em placas de 6 *wells* (Nest, USA) e mantidas em meio GI 1640 (Sigma, St. Louis, USA), acrescido de 11 mM de glicose, 2,5 % de soro fetal bovino (FBS), 10 mM de Hepes, 1 mM de piruvato, 50 µM de Beta mercapto, 100 U/mL de penicilina (Sigma, St Louis, USA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma, St. Louis, USA), em atmosfera umedecida e ao atingir 90 % de confluência foram ou não tratadas com 5 mM de ácido fenilacético (PAA - P16621, Sigma Aldrich, USA), conhecido inibidor da piruvato carboxilase, por 12 ou 24 horas.

2.2. Grupos experimentais

2.2.1 – Células musculares C2C12 e primárias

- a) Controle
- b) Transfectado (superexpressão da piruvato carboxilase)
- c) Ácido Graxo (tratado com ácido palmítico)
- d) Ácido Graxo e transfectado (tratado com ácido palmítico e com superexpressão da piruvato carboxilase)

2.2.2 – Grupo de animais

- a) Controle
- b) Dieta hiperlipídica
- c) Camundongos isogênicos *ob/ob*

2.2.3 – Células HEK 273T

- a) Controle
- b) Transfectado (superexpressão da piruvato carboxilase)
- c) Inibição da PC (SiRNA)

2.2.4. – Células INS e ilhotas isoladas

- a) Controle
- b) Tratada com ácido fenil acético (5 mM)

2.3. Indução da resistência à insulina com ácido graxo

Experimentalmente, o quadro de resistência à insulina tem sido demonstrado em animais submetidos à dieta hiperlipídica ou células isoladas expostas a altas concentrações de nutrientes, como o ácido palmítico (Randle et al. 1963). Baseado nesses estudos, uma solução estoque de ácido palmítico (C16:0, Sigma, St. Louis, USA) (100 mM) foi preparada. Anterior à aplicação nas células, o ácido graxo foi diluído em DMEM (1:133 μ L) e conjugado a albumina (1%) (Haber et. al., 2013). A concentração final de ácido palmítico no meio de cultura foi de 500 μ M. Este tratamento induz aumento do conteúdo intracelular de triacilglicerol diminuindo a captação de glicose (Sabin et.al, 2007 e Muoio et.al., 2008). As células foram incubadas por um período de 24 horas com ácido palmítico.

2.4. Transfecção e inibição

O plasmídeo (MR211759) da origene (figura 3), contendo o gene de expressão da enzima mitocondrial piruvato carboxilase (PCX) foi amplificado em bactérias (Top10 E.coli,

Invitrogen, Karlsruhe, Germany). As células C2C12, primária e HEK após atingirem confluência de 70% (mioblastos), foram lavadas e o meio de cultura trocado por OPTIMEM (meio com reduzido de soro). O plasmídeo da PCX (5 µg) ou o SiRNA da PC (SASI_Mm0100196797_AS) (100 nM) foi acrescido ao meio OPTMEM juntamente com o reagente p3000 (2 µL/µg de DNA). O tubo foi passado no vórtex e, após 5 minutos, o complexo citado foi associado com lipofectamina (5 µL/*well*), formando o complexo DNA-lipofectamina. Após a associação, o volume foi adicionado no meio contendo as células pelo período de 24 horas.

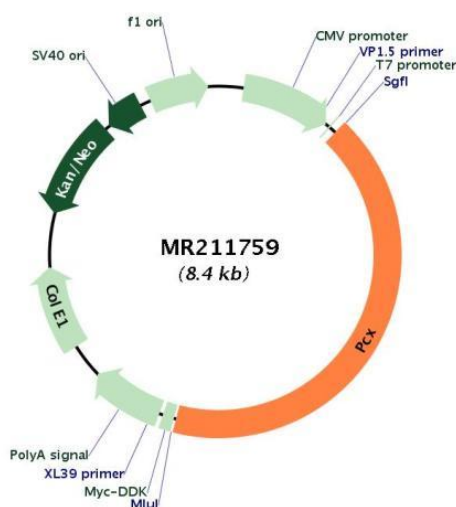


Figura 3. Mapa do plasmídeo utilizado, contendo o trecho do gene que expressa a PC.

2.4.1. Seleção de células musculares C2C12 transfectadas

As células C2C12, após atingirem a confluência de aproximadamente 70% foram transfectadas conforme descrito nos métodos anteriormente. As células transfectadas com o plasmídeo da piruvato carboxilase foram selecionadas utilizando-se meio DMEM (10% soro fetal bovino) com neomicina 500 µg/mL. As células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm² contendo o mesmo meio até atingirem confluência de 70% novamente. Após isso, as células foram trispinizadas (1 % tripsina) e centrifugadas 1000 g, 25 °C por 5 minutos. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 1 mL de DMEM (10% soro fetal bovino) e foram plaqueadas 200 mil células por *well*. Após a confluência de 70%, as células foram incubadas com meio DMEM (10 % soro de cavalo), contendo 500 µg/mL de neomicina. Após a diferenciação induzida pelo meio contendo soro de cavalo por 5 dias (miotubos), as células foram utilizadas para os experimentos.

2.5. Western Blotting

Inicialmente, as células foram homogeneizadas em tampão contendo Tris (50 mM pH 7,4) NaCl (150 mM), EDTA (1 mM), Triton X-100 (1%), deoxicolato de sódio (1 %) e solução de dodecil sulfato de sódio (SDS 1%), acrescido de inibidores de proteases (aprotinina, 5 µg/mL, leupeptina 1 mg/mL, fluoreto de fenilmetilsufonil PMSF a 2 mM) e inibidores de fosfatase (ortovanadato de sódio a 100 mM; pirofosfato de sódio a 100 mM, fluoreto de sódio a 10 mM). As amostras foram sonicadas por 30 segundos, vortexadas e incubadas no gelo por 30 min. Em seguida, foram centrifugadas a 15000 g, 4 °C por 20 minutos. Uma alíquota do sobrenadante contendo o lisado de células foi utilizada para determinação da concentração de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). Para a determinação de proteínas, estas foram fracionadas por SDS-PAGE por eletroforese em gel SDS-PAGE. As amostras foram aquecidas a 97 °C por 3 minutos e 40 µg de proteína foi aplicada em um sistema mini-gel vertical 8, (modelo Protean III Cell Biorad®) de acrilamida: bisacrilamida com 1,5 mm de espessura e gel de separação de 10 % ou 8 % de acordo com a proteína analisada. Foi utilizado marcador de peso molecular (Biorad® All Blue e Dual Color) contendo proteínas conhecidas de 10 a 250 kDa. As corridas eletroforéticas foram realizadas em cubas de acrílico utilizando tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 115 mM, SDS 0,1%, mantido a 4 °C) sob potencial de 100 volts, durante 2 horas. Após corrida eletroforética, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram transferidas para membrana de PVDF (GE *Healthcare*), de acordo com o método descrito por Towbin et al. (1979) utilizando tampão de transferência (Tris-HCl 24,8 mM, glicina 192 mM) potencial de 110 V e corrente de 400 mA em equipamento *Biorad® Trans-Blot SD Cell, EUA*. A membrana foi bloqueada a temperatura ambiente por 1 hora em tampão TBS-T (Tris-HCl 0,02 M, NaCl 0,16 M e Tween-20 0,1%, pH 7,4) contendo leite desnatado em pó (10%) ou BSA (5%) e incubada overnight (4°C) com diluições recomendadas de anticorpos primários, PC (Abcam 128952), CS (Abcam 96600), PPAR γ (Abcam19481), PGC1 (Calbiochem mAb4C1.3), citocromo C (Cell Signaling 136F3), Akt-total (Cell Signaling #9272) e Akt-fosforilada (Cell Signaling S473), OXPHOS (abcam ab110413), AMPK α total (Cell Signaling #25325), SIRT 3 (Cell Signaling #2627) e β -actina (Santa Cruz 81178). Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes por 5 minutos com TBST e, em seguida, incubada com anticorpo secundário conjugado com peroxidase em solução TBST contendo leite (2%) ou BSA (1%) por 1 hora. Em seguida, foram realizadas três lavagens de 10 minutos com TBST.

Após as lavagens, a membrana foi incubada por um minuto com reagente de detecção: *Western Blotting Amersham ECL (GE Healthcare)*.

2.6. Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas das amostras foi determinada através de absorvância 595 nm, onde foi feita uma curva padrão em concentrações crescentes de proteína (albumina) e as amostras foram diluídas 20 vezes para a determinação da concentração. O método tem como base o protocolo de Bradford (1976).

2.7. Reação de transcrição reversa (RT)

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA total (2 µg) com a seguinte mistura de reagentes: 146 ng de *random primers* e 200 U da enzima transcriptase reversa, tampão da enzima (Tris-HCl a 50 mM (pH 8), KCl a 75 mM, MgCl₂ a 3 mM), DTT (5 mM), dNTP (500 µM) no volume final de reação de 20 µl. Esta mistura foi incubada por 2 min (25 °C), permitindo a hibridização dos oligonucleotídeos ao RNA. Após isso a amostra foi aquecida a 42°C por 60 minutos e 70°C por 15 minutos.

2.7.1 Expressão gênica (mRNA)

As células musculares C2C12, primárias e HEK 293T (200 mil células) foram lisadas em Trizol (1 mL), acrescidas de clorofórmio (200 µL) e centrifugadas (12.000 g). A fase aquosa foi transferida e adicionado isopropanol (1 mL). O RNA formado foi lavado com etanol (75%) e centrifugado a 7.000 g por 5 min. O sedimento de RNA foi seco à temperatura ambiente, ressuspenso em água livre de RNase e armazenado a -80°C. A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria (260/280 nm).

2.8. Reação de PCR em tempo real (RT-PCR)

A expressão dos genes foi quantificada por PCR em tempo real. As reações foram realizadas em mistura (20 µL) contendo cDNA da amostra (1 µL), sequência de primers (0,5 µL), água DEPC (10,5 µL) e *mix SYBR Green PCR Master* (12,5 µL); (dNTP, tampão de reação, Taq DNA polimerase e *SYBER Green I*) (Invitrogen). As condições do PCR foram previamente estabelecidas as sequências de *primers* de acordo com a tabela 1, descrita abaixo.

PRIMER	ESPÉCIE	EMPRESA	SEQUÊNCIA
Piruvato Carboxilase	Camundongo/Rato	EXTEND	<i>Foward</i> ATCCTCCTCGGCCCTGTTG <i>Reverse</i> TCGGAGCAGGACACAGGGCA
PGC1 α	Camundongo/Rato	IDT	<i>Foward</i> CAAGCCAAACCAACAACCTTTATCTCT <i>Reverse</i> CACACTTAAGGTTTCGCTCAAAAGT
Citrato Sintase	Camundongo/Rato	SIGMA	<i>Foward</i> GTGTCAGATGAGAAGTTACGAGAC <i>Reverse</i> TCCTTAGGCAGATGTTTCAG
Receptor de Estrógeno alfa (ESRR α)	Camundongo	SIGMA	<i>Foward</i> GCCTCCAATGAGTGTGAGATC <i>Reverse</i> TTTGTACTTCTGCCGTCCG
B-HAD	Camundongo/Rato	SIGMA	<i>Foward</i> TCTTGACTATGTTGGACTGGATAC <i>Reverse</i> AAGGACTGGGCTGAAATAAGG
Sirtuína 1	Camundongo	EXTEND	<i>Foward</i> CAGTGTCTATGGTTCCTTTGC <i>Reverse</i> CACCGAGGAACCTACCCTGAT
Fator de transcrição mitocondrial (TFAM)	Camundongo/Rato	EXTEND	<i>Foward</i> CACCCAGATGCAAAACCTTTCAG <i>Reverse</i> CTGCTCTTTATACTTGCTCACAG
Succinato desidrogenase (SDH)	Rato	SIGMA	<i>Foward</i> ACCCCTTCTCTCTCTACCG <i>Reverse</i> AATGCCCGCTTCTCCTTGTAG
Citrato Sintase	Humano	IDT	<i>Foward</i> CTACACGGTCCTGTTTGGGG <i>Reverse</i> CTAAGGCTCGGCTCCAGATG
Carnitina Palmitoil transferase 1 (CPT1)	Humano	IDT	<i>Foward</i> AGGCCTATTTTGACGTGGG <i>Reverse</i> AACGTCACAAAGAACGCTGC
Receptor de Estrógeno alfa (ESRR α)	Humano	IDT	<i>Foward</i> CTCACAGGATGCCACACCAT <i>Reverse</i> CAGGCCACAAGGAAGAGGAG
<i>Peroxisomeproliferator activated receptor (PPAR delta)</i>	Humano	IDT	<i>Foward</i> AAAGAGGAAGTGGCAGAGGC <i>Reverse</i> TCCGGGAGAGGTCTGTGTAG
Fator de transcrição mitocondrial (TFAM)	Humano	IDT	<i>Foward</i> TCAGCATGCTAAAGAGGACGA <i>Reverse</i> TTGTGCGACGTAGAAGATCC
Proteína Ribossomal L 39 (RPL 39)	Camundongo		<i>Foward</i> CAAAATCGCCCTATTCTCTCA <i>Reverse</i> AGACCCAGCTTCGTTCTCCT

Tabela 1. Lista de *primers* utilizados.

2.9. Biogênese mitocondrial

O conteúdo do co-fator de transcrição (PGC-1 α) e de Sirtuinas foram mensurados por mRNA e Western Blotting. A fosforilação da proteína AMPK foi analisada por *Western Blotting*.

2.10. Consumo de oxigênio

As células foram mantidas em placas de 6 *wells* ou garrafas de 75 cm² após a transfecção e a seleção descrita anteriormente. Após a seleção e o tratamento com ácido palmítico (600 μ M), as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 g, 25°C por 5 min. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS (1 mL) contendo glicose 5,6 mM, pH 7,3. O consumo de oxigênio das células foi monitorado em respirômetro (*Oroboros Oxygraph-2K*). As células (4x10³) foram contadas em câmara de *Neubauer* e incubadas em câmara fechada contendo 2,1 mL de meio de respiração (Sacarose 125 mM, HEPES a 10 mM, KCl 65 mM e MgCl 1 mM) em pH 7,4.

2.11. Reações Bioquímicas

2.11.1. Determinação de lactato no meio de cultura

Para a determinação de lactato produzido no meio de cultura, o meio DMEM foi retirado e, após duas lavagens utilizando 1 mL de PBS para retirar o excesso de fenol, as células foram incubadas com 1 mL de PBS a 37 °C, por 3 horas, em placas de 6 *wells*. Em seguida o meio foi coletado e o sobrenadante analisado. Para a detecção do lactato foi utilizado 1 μ g da enzima lactato desidrogenase e 15 mM de NAD⁺. A reação foi tamponada com TRIS-Hidrazina-HCL (0,1 M de hidrazina e 50 mM de Trizma Base) em pH 7,2. Como controle positivo, foi utilizada a droga rotenona na concentração de 1 μ M. O lactato foi determinado por reação enzimática após a realização de curva padrão. A leitura foi realizada com o comprimento de onda 360 de excitação e 460 de emissão (BERGMEYER, 1965).

2.11.2. Determinação de NADH de células musculares C2C12

Após as células atingirem a confluência ideal (miotubos), o meio foi retirado e lavado uma vez com PBS filtrado. Foi adicionado 50 μ L de KOH (0,5 M) para cada 3 *wells* e as células foram raspadas e, em seguida, incubadas por 10 minutos a 70 °C com agitação de 800

g. Após a agitação, as células foram mantidas em gelo e centrifugadas 15000 g por 30 segundos a 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o pH ajustado para 7 utilizando HCl 3 N. Após o ajuste do pH, foi realizada centrifugação 15000 g por 5 minutos 4 °C. Após todo procedimento de extração descrito, a análise foi realizada em fluorímetro, utilizando-se de tampão fosfato pH 7,4 (NaH_2PO_4 0,1 M), 1 mM de piruvato e 1 µg de lactato desidrogenase, a leitura foi realizada em comprimento de onda 360 de excitação e 460 de emissão, (BERGMEYER, 1965).

2.11.3. Determinação de NAD^+ de células musculares C2C12

Após as células atingirem a confluência ideal (miotubos), o meio foi retirado e lavado uma vez com PBS filtrado. Foi adicionado 50 µL de ácido perclórico (0,5 M) para cada 3 *wells* e as células foram raspadas e, em seguida, incubadas por 5 minutos a 37 °C com agitação de 800 g. Após a agitação, as células foram mantidas em gelo e centrifugadas 15000 g por 30 segundos 4 °C. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e o pH ajustado para 7 utilizando KHCO_3 0,5 M. Após o ajuste do pH, foi realizado mais uma centrifugação 15000 g a 20000 g por 5 minutos 4 °C. Após todo procedimento de extração descrito, a análise foi realizada em fluorímetro utilizando-se de tampão tris-HCL hidrazina 50 mM, lactato de sódio 2 mM e 1 µg de lactato desidrogenase. A leitura foi realizada com o comprimento de onda 360 de excitação e 460 de emissão, (BERGMEYER, 1965).

2.11.4. Determinação dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) em células musculares C2C12 e HEK 293T

As células em cultura foram coletadas após os tratamentos previamente descritos com o meio de extração composto pelo ácido perclórico (0,5 M) em pH 7,0, com o auxílio de KHCO_3 a 1 M. A concentração dos intermediários foi realizada por meio de reações enzimáticas e curva padrão de cada intermediário. Para detecção de alfacetoglutarato, a reação ocorre por intermédio da enzima glutamato desidrogenase (9 U/mL) na presença do alfacetoglutarato (amostra), amônia (36 mM), ADP (2 mM) e NADH (450 µM) em meio com tampão fosfato pH 6,8, a 25°C. Para detecção de malato, a reação ocorre por intermédio da enzima malato desidrogenase (0,6 U/mL), na presença de malato (amostra) e NAD^+ (15 mM) em tampão hidrazina-glicina (pH 9) a 37°C. A concentração de oxaloacetato é determinada por intermédio da enzima malato desidrogenase (0,22 U/mL) com adição do substrato NADH (450 µM) em tampão fosfato (pH 6,8). Em todos os casos, as curvas padrões foram realizadas de acordo com a produção ou decaimento de NADH, realizada em spectrofluorescência, em comprimento de onda de emissão 360 e de excitação 460 (Bergmeyer, 1974).

2.11.5. Captação de glicose em células musculares C2C12

As células musculares C2C12 foram adicionadas em placas de 96 *wells* e mantidas em meio DMEM sem glicose pelo período de 2 horas. Após esse período as células foram lavadas com PBS sem glicose e, em seguida, foi adicionado 100 μ L o meio PBS contendo 25 mM de glicose. Após esse procedimento 25 μ L da sonda 2-NDGB (*Cayman chemical*, nº 11046) foi adicionada (480 μ M) e incubadas por 60 minutos, 37° C em estufa de CO₂. Após isso a insulina foi adicionada nos grupos tratados (0.02 U/mL) pelo período de 10 minutos. As células foram lavadas 3 vezes em meio PBS sem glicose e a leitura foi realizada por espectrofluorescência, com excitação de 485 nm e emissão de 535 nm. O valor total foi corrigido pela quantidade de proteínas.

2.12. Inibição farmacológica da piruvato carboxilase em C2C12

A inibição da enzima piruvato carboxilase foi realizada com a utilização de um fármaco, conhecido como ácido fenilacético. Um estoque de 50 mM foi preparado em solução de H₂O autoclavada e o pH foi ajustado para 7,4, utilizando-se NaOH. Foi adicionado nas células diferenciadas a concentração de 5 mM, por um período de 12 horas. Após esse tempo, foi adicionado o meio PBS com 25 mM de glicose para detecção de lactato produzido no meio, de acordo com o método descrito anteriormente. Após a incubação, as células foram coletadas para análises de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico e produção de lactato no meio.

2.13. Ensaio de imunofluorescência para detecção da piruvato carboxilase e mitocôndrias utilizando mitotracker

Para marcação de mitocôndrias por método de fluorescência, as células primárias de músculo esquelético foram plaqueadas, conforme descrito anteriormente, e, após atingirem a diferenciação e confluência ideal, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com 250 μ L da solução PBS por *well*. As células foram incubadas por 20 min em DMEM e *mitotracker red* a 0,5 μ M em incubadoras de CO₂ (5 %), temperatura de 37 °C. Em seguida, o meio foi descartado, as células lavadas novamente com PBS e, em seguida, adicionado paraformaldeído 4 % para fixação dessas (400 μ L por *well*) e mantidas 15 min na mesma incubadora descrita. O meio foi descartado e, novamente, lavado com PBS, por duas vezes.

As células foram incubadas com PBS, contendo 0,1% de triton (300 μ L por *well*) por 5 min. O meio foi descartado e, novamente, as células foram lavadas. Para identificar a piruvato carboxilase por imunofluorescência, foi utilizada como solução de bloqueio (PBS com 3% de albumina), por 20 min, na incubadora. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo primário da Abcam, Anti-PCB (ab128952), por 1 hora na incubadora. O meio foi removido e as células lavadas novamente e incubadas por 50 min na incubadora, com o anticorpo secundário alexa flúor 488 (1:200) diluído em PBS. O anticorpo secundário foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Como controle interno, foi utilizado um *well* incubado somente com anticorpo secundário. A placa foi armazenada na geladeira, contendo meio PBS, protegida da luz com a utilização de papel alumínio, para, em seguida, ser realizada as análises de fluorescência no equipamento *PerkinElmerOperetta*®

2.14. Secreção de insulina estimulada por glicose

Camundongos Swiss (105 dias de vida) foram sacrificados utilizando câmara de CO₂ e, após incisão abdominal, as ilhotas foram coletadas uma a uma após digestão do pâncreas por collagenase como descrito anteriormente por nosso grupo de pesquisa (Bordin et al.,1995). A secreção estática de insulina foi realizada após o isolamento, 5 ilhotas foram colocadas em reservatórios contendo 0,5 mL de solução de Krebs, suplementada com 0,5% de albumina bovina (m/v) e 5,6 mM de glicose por 30 min. Em seguida, as placas foram acondicionadas em banho-maria a 37°C e mantidas em ambiente controlado (umidificado e gaseificado com carbogênio). Após 30 minutos, a solução foi rapidamente removida e substituída por nova solução de incubação contendo 2,8 mM ou 22,2 mM de glicose e as células foram mantidas por 60 min e posteriormente transferidas para tubos de ensaio e armazenadas a -20 °C para posterior dosagem de insulina. A concentração de insulina nos diferentes experimentos foi determinada por radioimunoensaio.

2.15. Modelo de caracterização animal

A extração de tecidos de animais foi realizada de acordo com a lei 11.794, de 8 de outubro de 2008 que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais, do decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas – CEUA/UNICAMP. Os animais foram divididos em 2 grupos contendo 6 animais em cada. O grupo controle foram submetidos à dieta controle

padrão AIN93M (Reeves et al., 1993) e o segundo grupo (tratados com dieta hiperlipídica) foram alimentados com a dieta rica em gordura (HFD – 60% de lipídeos) durante 10 semanas a partir dos 30 dias de vida. Camundongos isogênicos *ob/ob* foram adquiridas em colaboração com o grupo do professor Dr Everardo Magalhães Carneiro e o aluno Jean Franciesco Vettorazzi, de acordo com o Comitê de Ética protocolo número 3815-1, sob vigência do projeto 07/2015-03/2017.

2.16. Análise estatística

Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram analisados pelo teste one-way/two-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Kruskal-Wallis quando comparado mais de dois grupos (amostras) (KRUSKAL & WALLIS, 1952). O teste t de *student* foi utilizado para comparação de duas médias, usando o programa Prisma 6.0. O valor de “p” ≤ 0.05 foi adotado para considerar médias estatisticamente diferentes.

3. RESULTADOS

3.1. Relação entre PGC1- α e piruvato carboxilase em diferentes tecidos

Como validação experimental, decidimos avaliar a expressão dos genes da PC e do PGC1- α em tecidos e animais com diferentes capacidades oxidativas. Na figura 4 podemos observar que a expressão de PC demonstrou forte relação com a expressão do indutor de biogênese mitocondrial, PGC1- α , indicando que a expressão da PC acompanha a expressão do PGC1- α . Esse efeito foi evidenciado no tecido adiposo marrom, tecido com elevado potencial oxidativo, exibindo aumento substancial no conteúdo de mRNA da PC e do PGC1- α , comparado ao músculo sóleo de camundongos controles e de células musculares primárias. Ao passo que, no tecido adiposo branco, tecido com baixo potencial oxidativo, no músculo sóleo de camundongos tratados com dieta hiperlipídica e de camundongos *ob/ob* e de células musculares expostas ao ácido palmítico, observamos reduzida expressão desses genes.

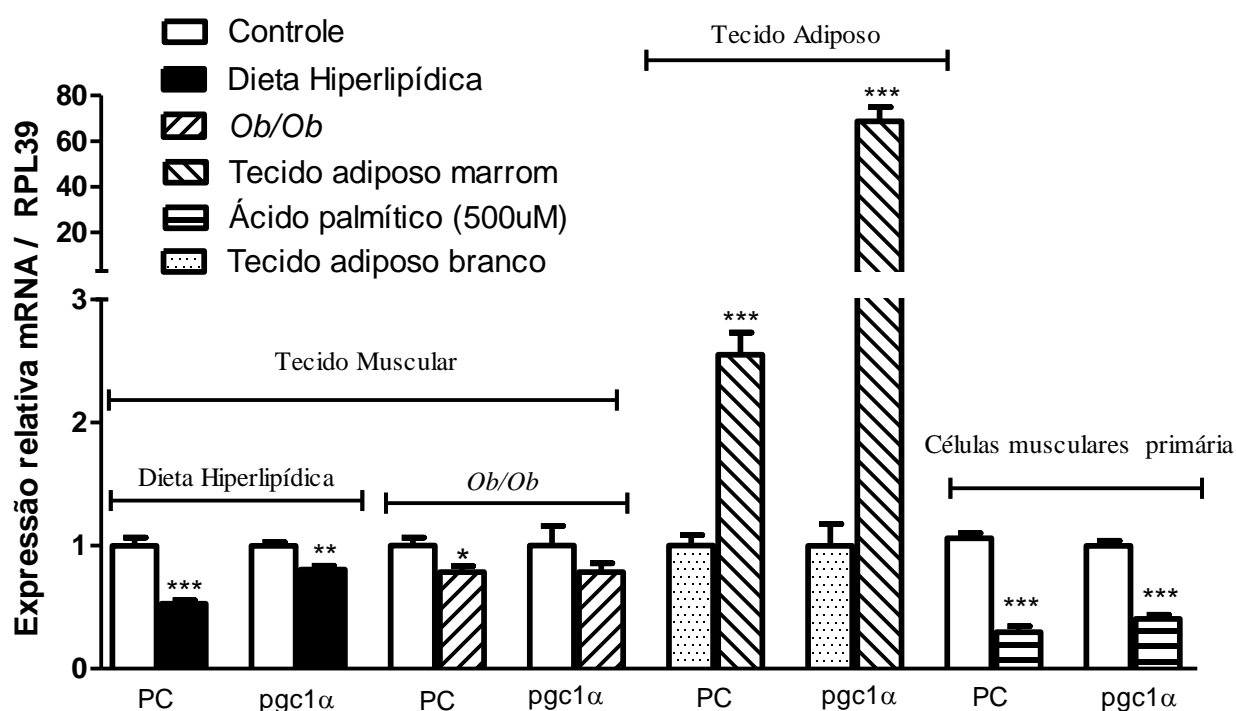


Figura 4. Expressão gênica relativa da enzima piruvato carboxilase e da proteína PGC1 α . O conteúdo do RNA mensageiro foi determinado em amostras extraídas do tecido adiposo branco inguinal, marrom e em amostras de músculos sóleo de camundongos C57 black controles. Há também uma redução no conteúdo de mRNA em tecidos de animais submetidos a dieta hiperlipídica (10 semanas) e de animais transgênicos *ob/ob*. As análises também foram realizadas em amostras de células de cultura musculares primária controles e expostas ao ácido palmítico durante 24h. n=4 experimentos. *** P<0,0001, ** p<0,001 e * p< 0,05 ANOVA two way.

3.2. Transfecção em células HEK 293T

Inicialmente, testamos a eficiência de transfecção da PC em células HEK 293T. Como descrito anteriormente na metodologia, as células foram transfectadas com 95% de confluência e, 48 horas após, analisamos a eficiência de transfecção utilizando o plasmídeo contendo GFP (PCMV_GFP). A intensidade de fluorescência do GFP, a confluência e a morfologia das células estão apresentados na figura 3. Podemos observar que as células apresentaram eficiência de transfecção relativamente alta, acompanhada de confluência superior a 80% e da morfologia adequada.

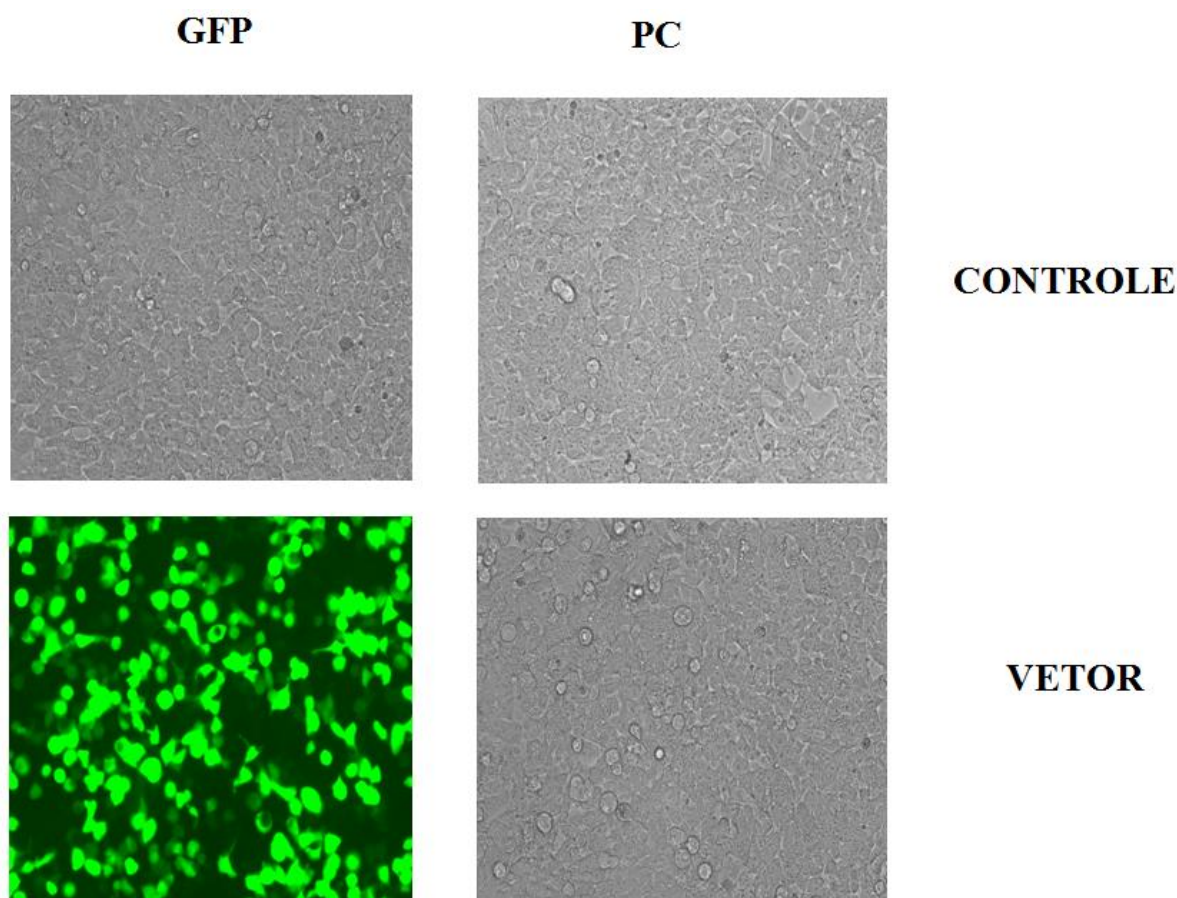


Figura 5. Eficiência de transfecção (GFP) e morfologia das células controle e com a superexpressão da enzima piruvato carboxilase (PC).

3.3. Efeito da superexpressão de PC na indução de genes oxidativos em células HEK

Os resultados mostram que a superexpressão da PC induziu aumento expressivo na transcrição da PC. Embora este aumento não tenha sido associado com a indução na transcrição de genes mitocondriais, a inibição de expressão de PC diminuiu significativamente a expressão dos genes selecionados, indicando a importância dessa proteína na expressão de genes associados ao programa gênico mitocondrial.

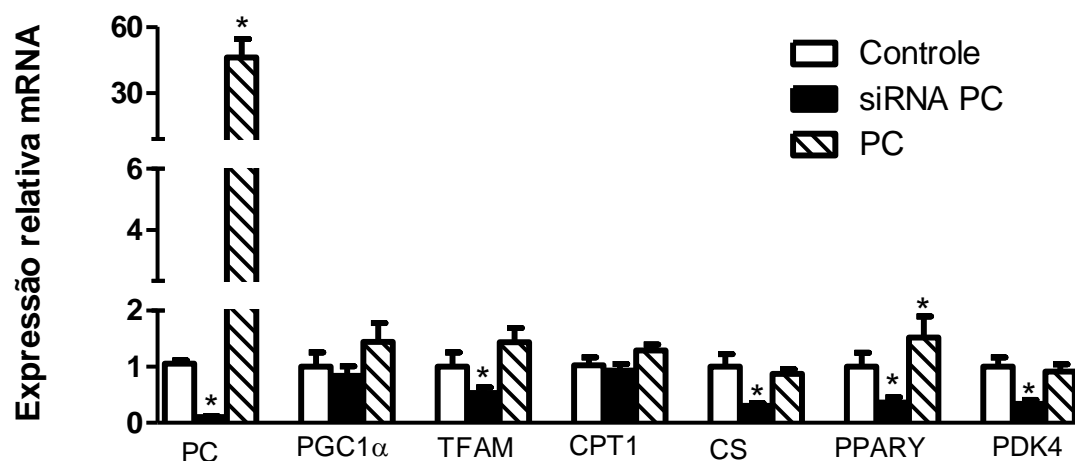


Figura 6. Expressão relativa de diversos genes mitocondriais em células HEK 293T com a enzima piruvato carboxilase silenciada (siRNA) e superexpressa (PC). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle ANOVA Two Way.

3.4. Efeito da superexpressão de PC nas concentrações de lactato e de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico em células HEK 293T

Um achado importante desse estudo mostra que o aumento na expressão de PC em células HEK 293T contribuiu para a redução significativa nas concentrações de lactato liberado no meio extracelular, indicando fortemente redução na glicólise anaeróbia dessas células e, consequentemente, sugerindo predominância de metabolismo oxidativo. De fato, observações de que as concentrações dos intermediários do CAT estão substancialmente aumentados em células com a superexpressão de PC, ao passo que, a inibição da sua transcrição com siRNA reduziu o conteúdo dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, fortalece essa sugestão, indicando aumento de metabolismo oxidativo. Como controle positivo para as amostras de lactato, foi adicionado a droga rotenona (1 μ M) para estimular a via glicolítica e produção de lactato.

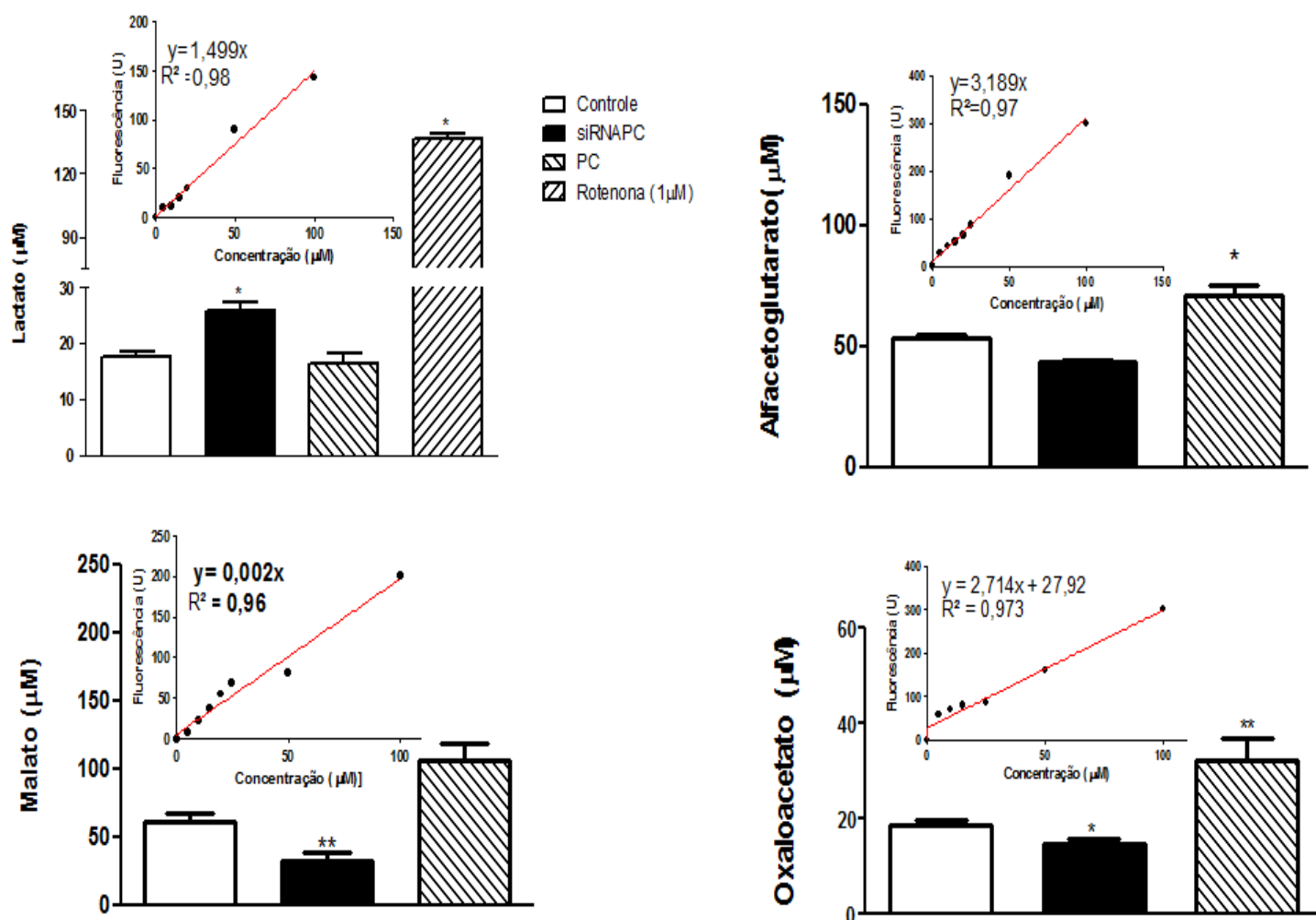


Figura 7. Concentração de lactato e de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (ICAT). Concentração de lactato liberado no meio de cultura contendo meio PBS (25mM de glicose) por 3 horas (painel A). Concentração de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico em extrato celular de células HEK 293T transfectadas com o vetor de expressão ou RNA de interferência da PC. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados ao controle

3.5. Transfecção em células musculares C2C12

Conforme descrito na metodologia, as células C2C12 foram transfectadas, utilizando-se o vetor da PC, contendo o gene PCX e um vetor controle para comparar a eficiência de transfecção (PCMV_GFP). Além da intensidade de fluorescência do GFP, foi realizada a análise do conteúdo de mRNA de PC. Podemos observar na imagem de fluorescência, uma eficiência de transfecção relativamente boa comparando as imagens de células controles com as células transfectadas com o vetor contendo GFP (painel A, figura 8). A eficiência foi ainda examinada pelo conteúdo de transcrito da enzima. Como indicado no painel B, a transcrição relativa de PC foi aumentada em mais de 100 vezes confirmando a eficiência de transfecção.

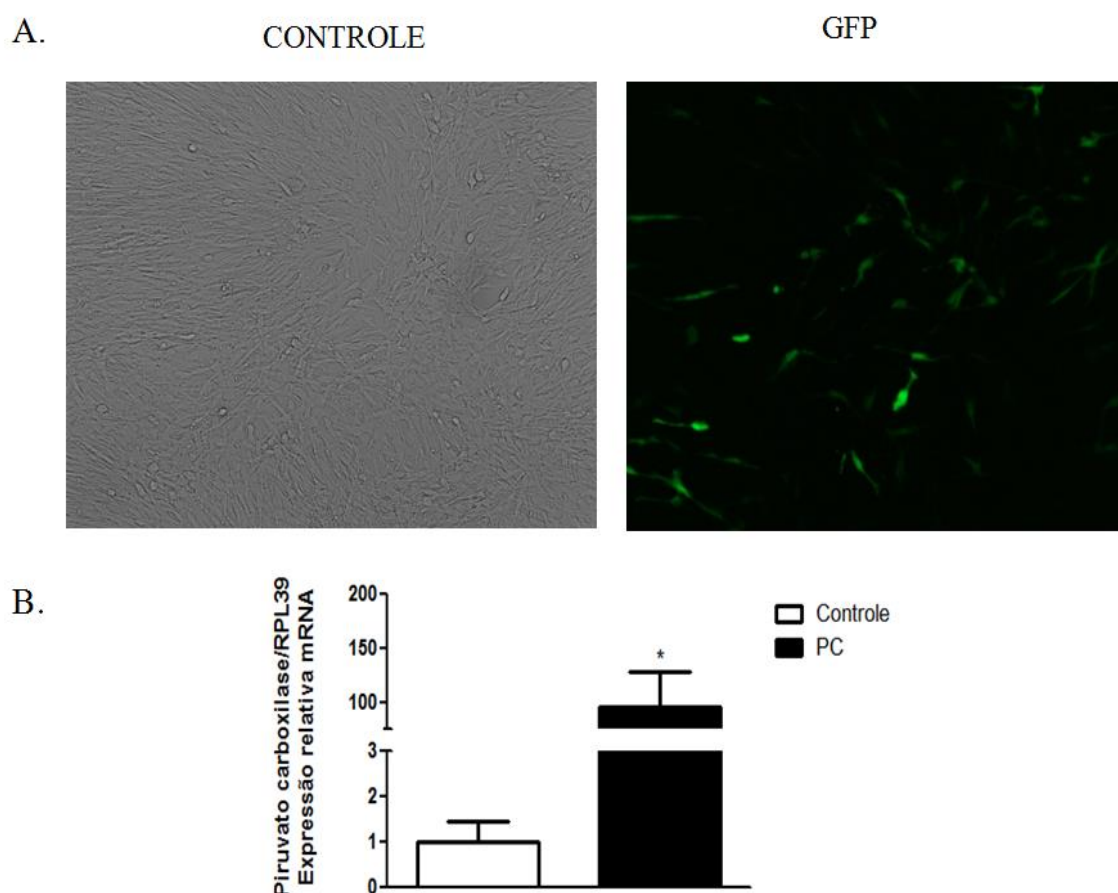
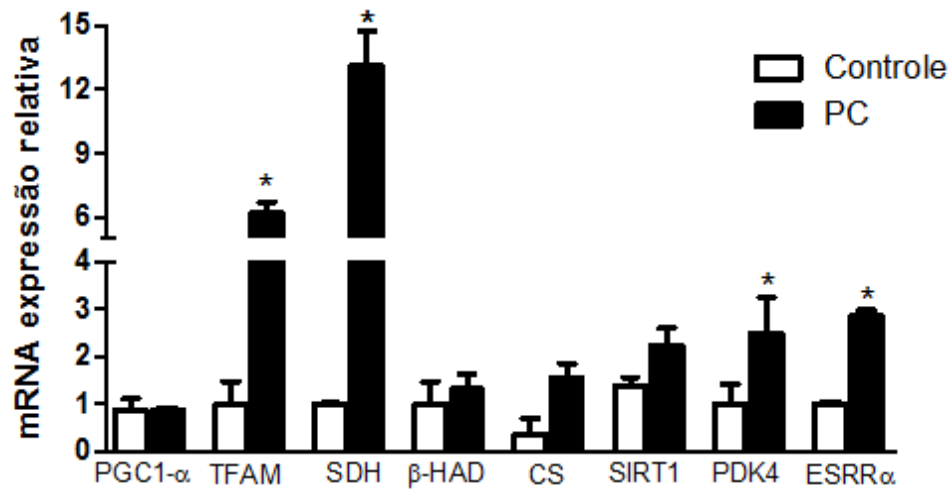


Figura 8. Eficiência de transfecção em células C2C12. Imagem de células controles transfectadas com vetor vazio e de fluorescência de células transfectadas com vetor GFP (painel A). Conteúdo de mRNA da PC em células do grupo controle e superexpressando a piruvato carboxilase (PC). * $p < 0.01$ comparado ao grupo controle (painel B).

3.6. Efeito da superexpressão da PC na indução de genes oxidativos em células C2C12 e na reversão do quadro de resistência à insulina em cultura primária de células musculares

A superexpressão da PC em células C2C12 induziu aumento expressivo na transcrição do fator de transcrição mitocondrial TFAM, do gene da succinato desidrogenase e do receptor de estrógeno, indicando aumento indireto de biogênese mitocondrial nessas células. Porém, nenhuma alteração foi observada para os demais genes estudados, incluindo o PGC1 α , β HAD e SIRT1. Com esses resultados, podemos concluir que, apesar da superexpressão da PC não induzir o aumento na transcrição do PGC1- α como esperávamos, promoveu aumento significativo na expressão de genes importantes relacionados ao processo de biogênese e metabolismo mitocondrial, mostrando que a elevada expressão de PC promove essas alterações por mecanismo independente da expressão de PGC1- α , como demonstrado na figura 9. Células primárias de músculo esquelético de rato, após a diferenciação em miotubos, foram tratadas com ácido palmítico (500 μ M), pelo período de 24 horas. Como esperado, o tratamento com ácido palmítico reduz a expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial (NRF1, PGC1 α e PDK4) e ao metabolismo oxidativo (citrato sintase [CS]). É possível observar que a superexpressão da PC em células controle não altera a expressão de genes mitocondriais neste modelo celular de cultura primária. Por outro lado, quando tratamos as células com ácido palmítico, podemos observar redução nos níveis de RNA mensageiro dessas proteínas e, interessantemente, a superexpressão da PC atenua esse efeito, aumentando a expressão desses genes.

A.



B.

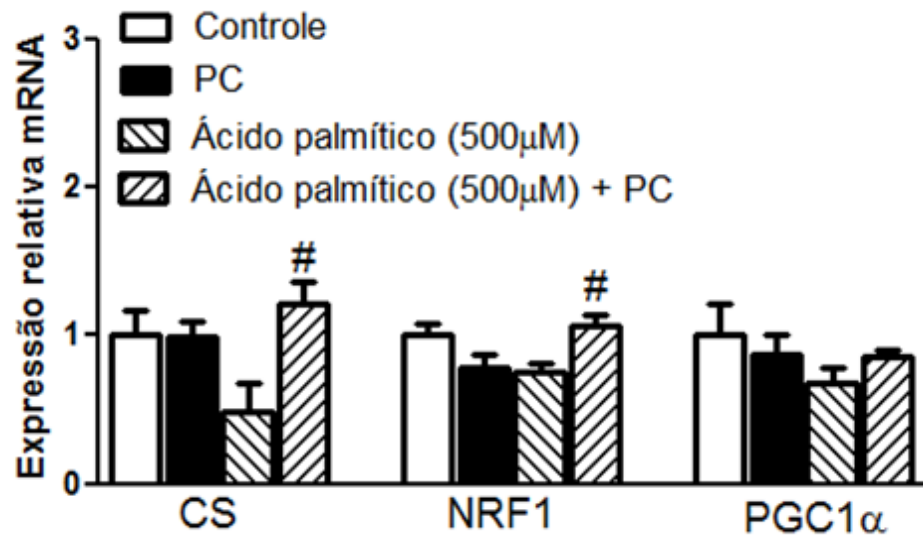


Figura 9. No painel A podemos observar a expressão de genes mitocondriais, em células musculares C2C12, do metabolismo de lipídeos e genes associados ao programa de biogênese de mitocôndrias: *peroxissomo proliferador-ativador receptor gama 1 alfa* (PGC1 α), fator de transcrição mitocondrial A (TFAM) succinato desidrogenase (SDH), sirtuina 1 (SIRT1) citrato sintase (CS), piruvato desidrogenase quinase 4 (PDK4) hidroxiaçil CoA desidrogenase (β -HAD) e receptor relacionado de estrogênio (ESRR α). *p<0.05 comparado com o grupo controle. No painel B, podemos observar a expressão dos genes CS, fator respiratório nuclear 1 (NRF1) e PGC1 α em grupos controle, após a exposição a ácido palmítico por 24 horas e exposto ao ácido palmítico com a superexpressão da piruvato carboxilase em células de músculo esquelético primárias. #p<0,05 comparado com o grupo ácido palmítico (500 μ M).

3.7. Efeito da inibição farmacológica da PC nas concentrações de lactato e intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico em células musculares C2C12

Para verificar a importância da enzima piruvato carboxilase na glicólise anaeróbia e no metabolismo oxidativo, foi mensurado a concentração de lactato liberado no meio de cultura e o conteúdo de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico em células controles e tratadas com o inibidor da piruvato carboxilase (ácido fenilacético), por 12 horas, na concentração de 5 mM. É importante observar que, nessas condições, houve aumento nas concentrações de lactato e redução significativa nas concentrações dos intermediários: malato, alfacetoglutarato e oxaloacetato, sugerindo fortemente que a redução na atividade de PC diminui a capacidade oxidativa de células musculares.

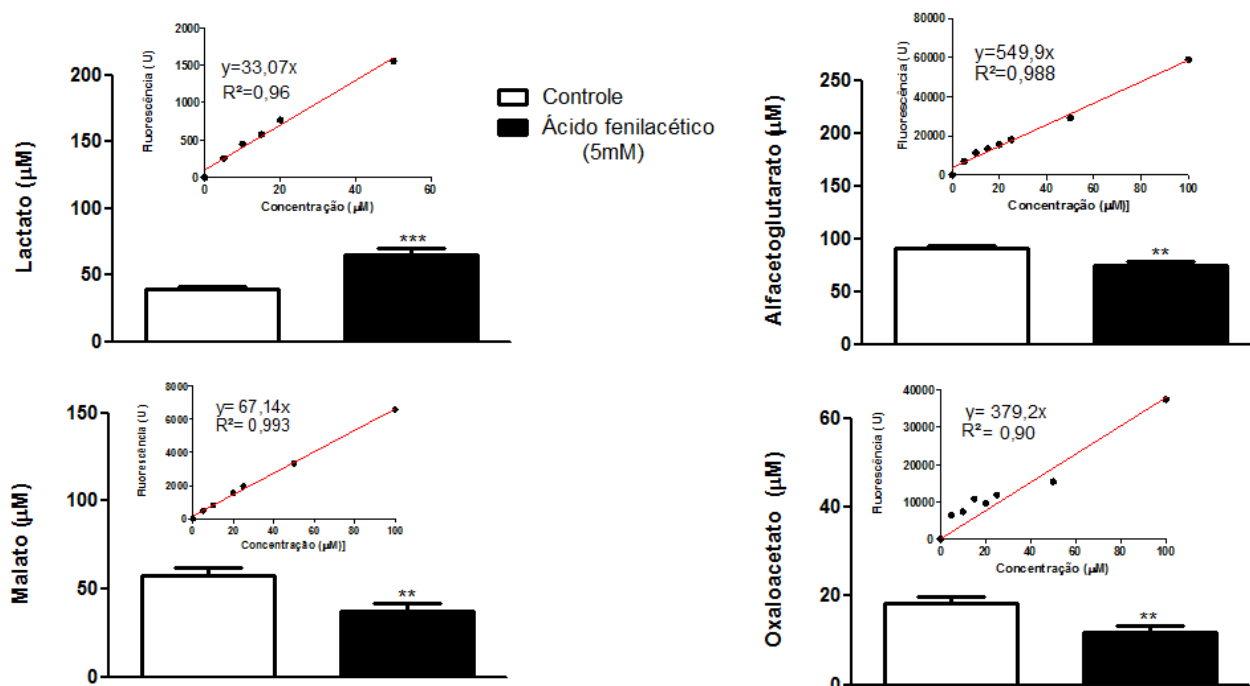


Figura 10. Concentração de lactato e de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (ICAT). Concentração de lactato liberado no meio de cultura PBS (25 mM de glicose) incubado por 3 horas e concentração de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico em extrato celular de células tratadas com ácido fenilacético (5 mM) pelo período de 12 horas. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparados ao controle.

3.8. Transfecção da piruvato carboxilase em células primárias de músculo de rato Wistar

Como observado na figura 1, o plasmídeo da piruvato carboxilase contém o peptídeo sinal que o direciona para a mitocôndria. Para verificar a eficácia do plasmídeo, foi realizada a marcação de mitocôndria utilizando mitotracker e a marcação da piruvato carboxilase utilizando-se os anticorpos específicos descritos nos métodos. Como podemos observar na figura 11, a piruvato carboxilase realmente foi direcionada para a mitocôndria, sendo superexpressa.

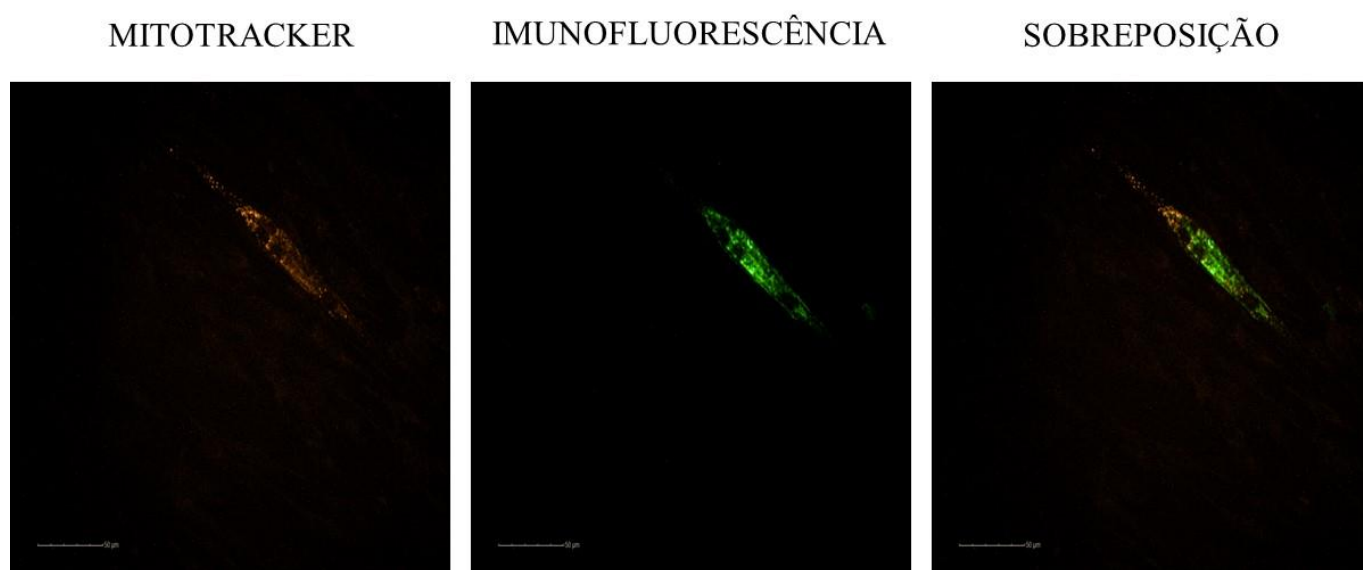


Figura 11. Marcação de mitocondriais (mito tracker) e sua sobreposição com a imagem de imunofluorescência (IF), utilizando-se do anticorpo da PC, mostrando o direcionamento para a mitocôndria.

3.9. Superexpressão da piruvato carboxilase reverte o quadro de resistência à insulina e disfunção mitocondrial provocada pela exposição à ácido palmítico, assim como aumenta o conteúdo de HIF 1 α

Sabe-se que o aumento da entrada de glicose na célula promove alteração na expressão de diversos genes e na tradução de diversas proteínas. Dentre elas, o fator induzido por hipóxia α (HIF1 α), importante sinalizador que melhora da captação de glicose, visto que ele ativa a via glicolítica, aumenta o conteúdo de PGC1 α e a entrada de glicose em células musculares. Podemos observar que a superexpressão da piruvato carboxilase aumenta o conteúdo de HIF1 α , assim as células submetidas ao estímulo elétrico e o controle positivo cloreto de cobalto (CoCl₂), demonstrado no painel B da figura 12. Corroborando com estes achados, confirmamos nossa hipótese analisando o conteúdo da proteína kinase Akt fosforilada, como mostrado no painel B da figura 10. Podemos observar que houve aumento na fosforilação quando induzida por insulina no grupo controle. Porém, é possível observar diminuição no grupo tratado com ácido palmítico (500 μ M), tanto no basal quanto na presença de insulina, como esperado, indicando resistência a sinalização do hormônio. Interessantemente, observamos que há aumento da resposta à insulina nas células transfectadas com a PC, principalmente no grupo tratado com ácido palmítico na presença de insulina. Em adição, como controle positivo usamos células submetidas ao pulso de contração muscular elétrica a 0,3 V/mm, 4 ms a 1 Hz por segundo pelo período de 12 horas. Esses resultados demonstram que a superexpressão da piruvato carboxilase aumentou a resposta à insulina em células com baixa capacidade mitocondrial tratadas com ácido palmítico, revertendo o quadro de resistência ao hormônio (figura 12). Complementando esses dados, observa-se aumento na captação de glicose tanto no basal quanto estimulada por insulina nas células musculares C2C12 que estão superexpressando a PC (figura 13).

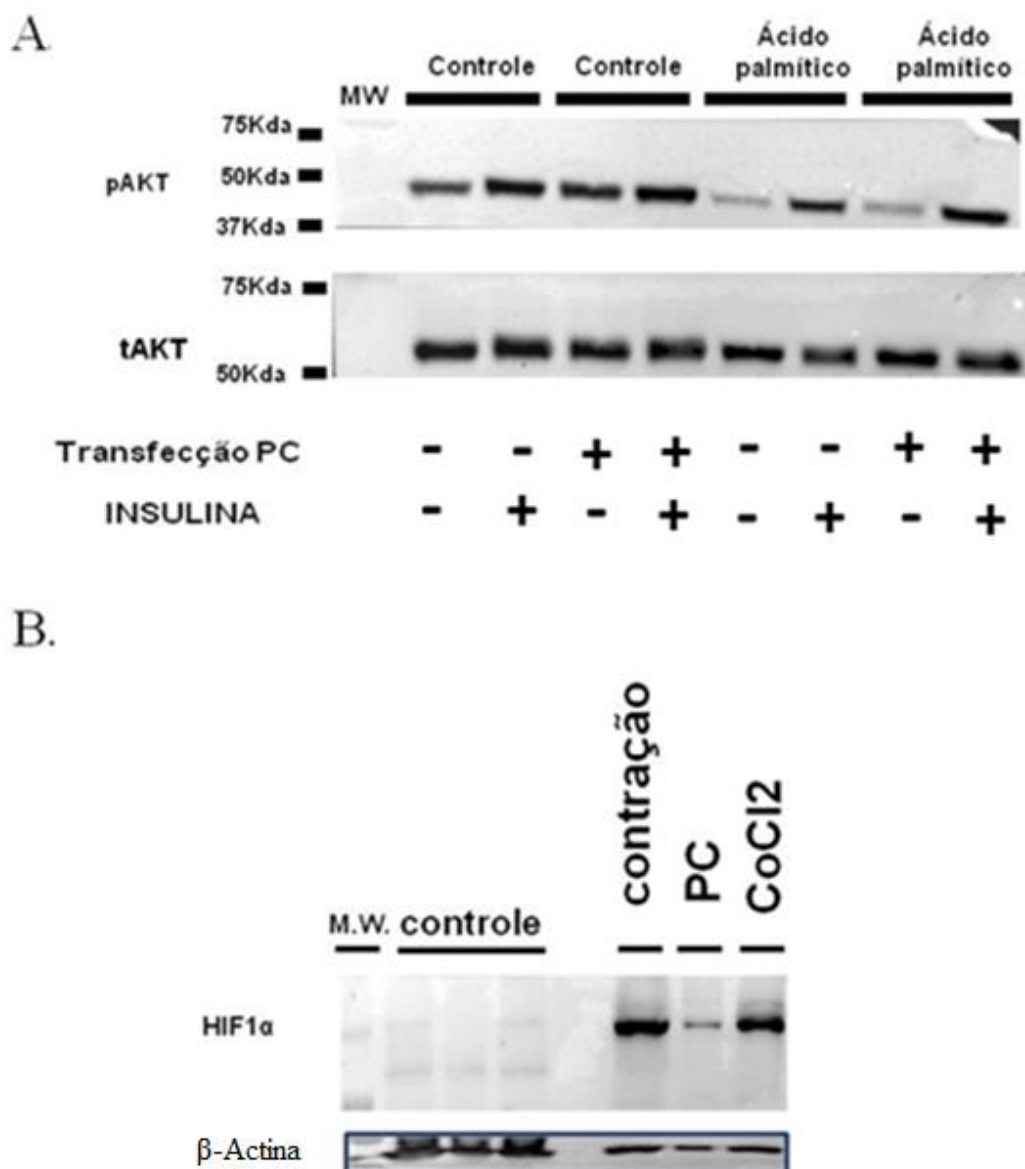


Figura 12. Conteúdo da proteína kinase AKT total e fosforilada, dos grupos controle, tratados com insulina (20.000U), superexpressando a proteína PC e tratados com ácido palmítico, como observado no painel A. Conteúdo da proteína HIF 1 alfa, comparado ao grupo controle células C2C12 induzidas à contração muscular, superexpressão de PC e controle positivo tratado com cloreto de cobalto (CoCl_2), como observado no painel B.

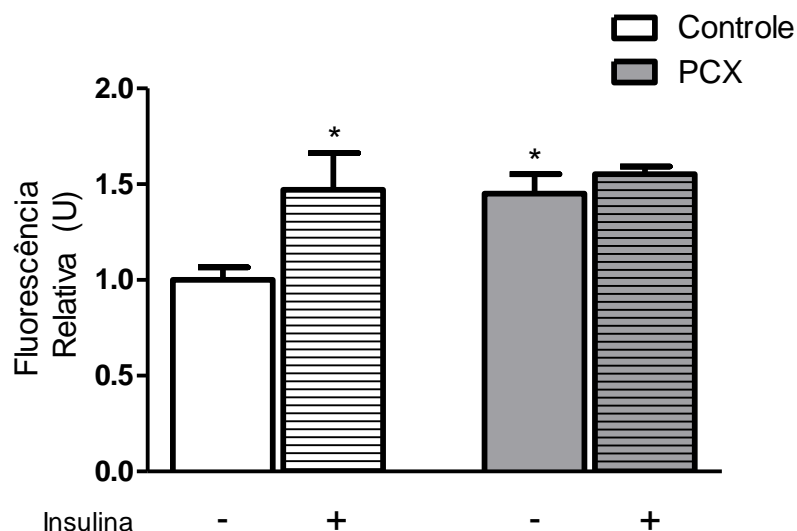


Figura 13. Captação de glicose em células C2C12 controle e transfectadas com PC estimuladas por insulina 20.000U. (n=3)

3.10. Inibição da piruvato carboxilase reduz a liberação de insulina em ilhotas β -pancreáticas e reduz genes oxidativos

A expressão gênica (mRNA) do co-fator de transcrição *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1* (PGC-1 α) foi analisado por RT-PCR. Além disso, a transcrição dos genes *pancreatic and duodenal homeobox 1* (PDX1), fator de transcrição mitocondrial (TFAM), fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK) e PC foi realizada, como observado no painel A. Como observado, os principais genes de resposta à insulina foram reduzidos, o que foi confirmado com a liberação de insulina de ilhotas controle estimuladas por glicose e na presença do inibidor da piruvato carboxilase, ácido fenil acético (PPA), como demonstrado no painel B da figura 14.

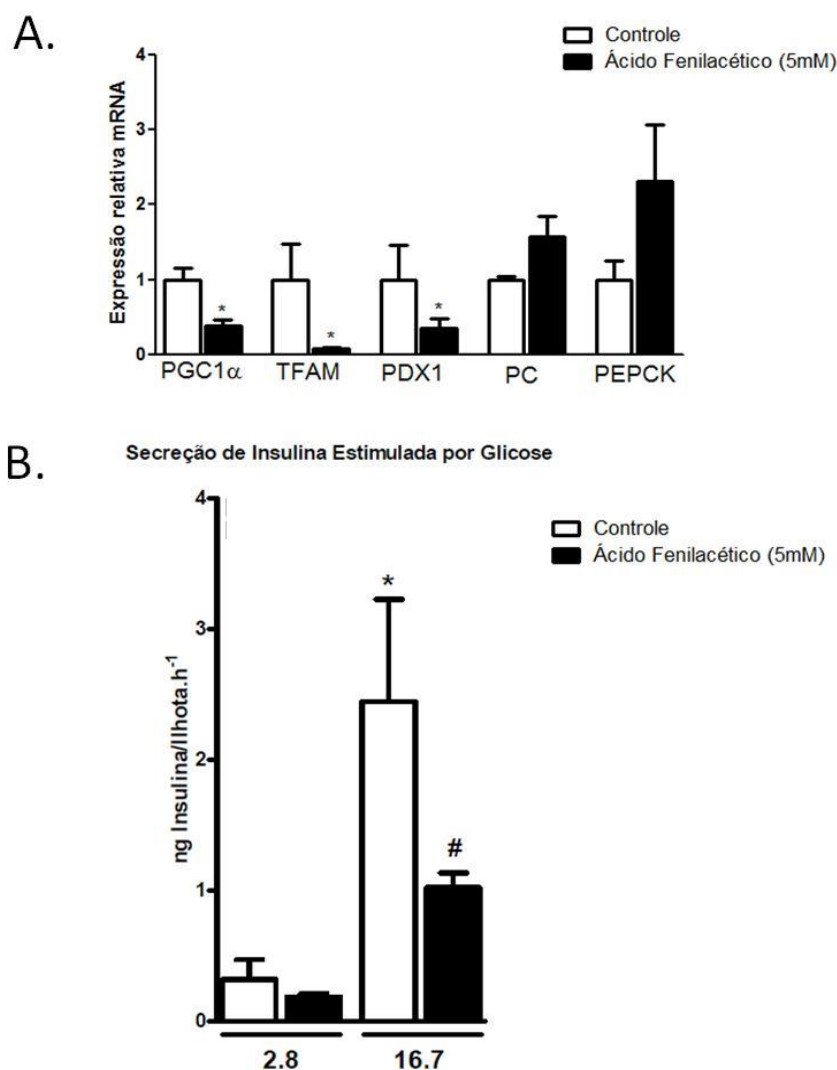


Figura 14. Expressão de genes relacionados à função mitocondrial de células beta pancreáticas (painel A). Conteúdo de insulina estimulada por glicose em ilhotas pancreáticas isoladas, em concentrações de 2.8 mM e 16.7 mM de glicose. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle 2.8 e # $p < 0,05$ comparado ao grupo ácido fenil acético (controle 2.8).

3.11. Efeito da superexpressão da enzima piruvato carboxilase na produção de NAD^+ e NADH em células musculares C2C12

De acordo com nosso estudo, a piruvato carboxilase exerce papel fundamental no metabolismo oxidativo, promovendo o fenômeno denominado como *shift* metabólico (mudança de metabolismo glicolítico para oxidativos e vice-versa). O mecanismo pelo qual isso acontece é o resultado do aumento excessivo na concentração de oxaloacetato. Este aumento favorece a reação contrária, o qual o oxaloacetato produzido é reconvertido em malato. Essa reação reversa gera NAD^+ . Sabe-se também que o acúmulo de malato na mitocôndria, leva a sua saída pela lançadeira *malate shuttle*. A saída do malato da mitocôndria, favorece a produção de NAD^+ , composto que também é produzido nesta reação.

Para comprovar nossa hipótese, foi feita a dosagem dos conteúdos de NAD^+ e NADH das células que superexpressam a PC. Como podemos observar na figura 15, a concentração de NAD^+ aumenta nas células que superexpressam a PC e os níveis de NADH reduzem. Podemos observar redução da razão NADH/NAD^+ o que leva ao aumento na função oxidativa para reestabelecer esta queda.

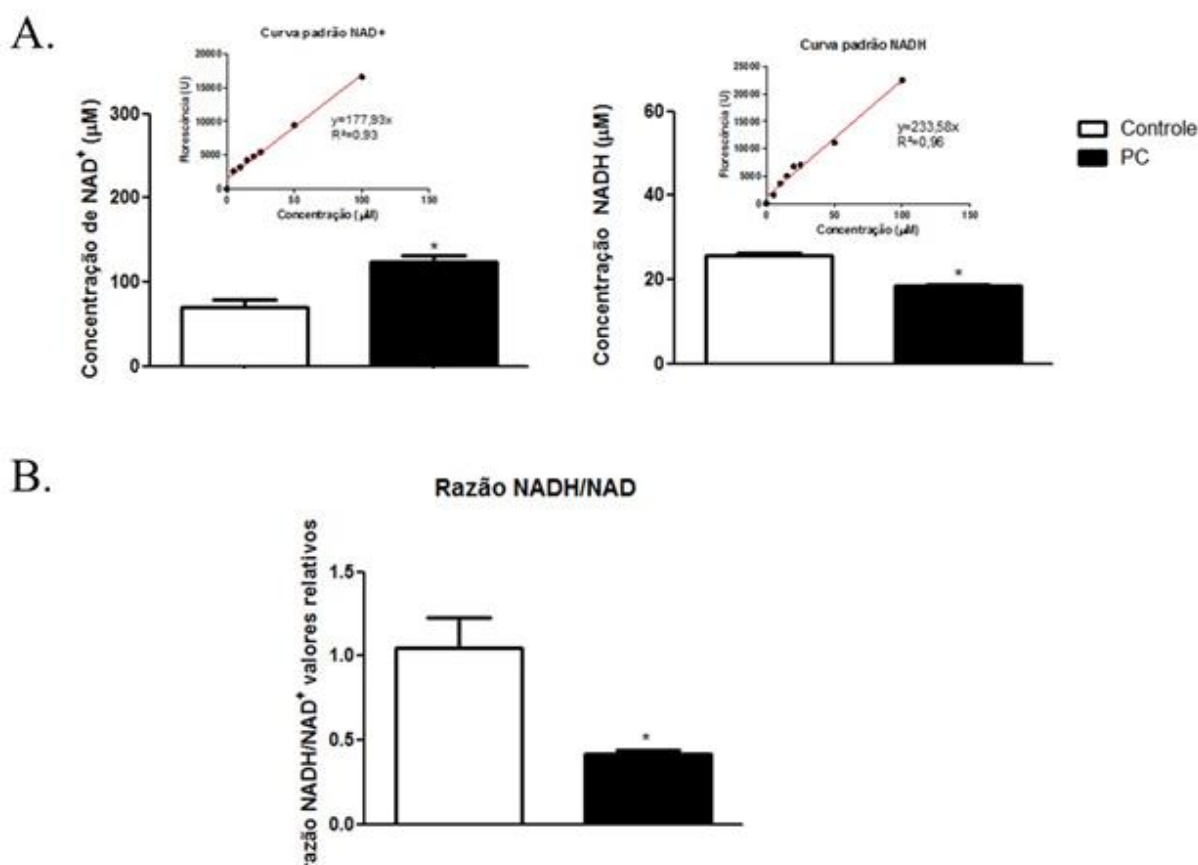


Figura 15. Concentração, em μM , de NAD^+ e NADH em células C2C12 controle, que superexpressam a PC e suas respectivas curvas padrão (painel A). Foi realizado também a razão (divisão da concentração de NADH por NAD^+), como observado no painel B.

3.12. Efeito da superexpressão da enzima piruvato carboxilase na concentração de malato citosólico e mitocondrial em células musculares C2C12

Segundo nossa hipótese, a superexpressão da PC pode favorecer a saída do malato da mitocôndria para o citosol através do transportador de malato, pelo desequilíbrio na reação que converte malato em oxaloacetato. A superexpressão da PC aumenta a concentração de oxaloacetato e, conseqüentemente, a reação reversa ocorre, acumulando malato. O malato acumulado sai da mitocôndria e faz com que ocorra cataplerose do ciclo de Krebs, o que poderia influenciar o aumento na respiração mitocondrial, pois há um mecanismo compensatório de retirada desses substratos do ciclo. Para confirmar nossa hipótese, foi realizado o fracionamento das células C2C12 em núcleo, citosol e mitocôndria e, em seguida, o malato foi mensurado. Como esperado, a concentração de malato no citosol de células

C2C12 superexpressando PC foi maior comparada ao grupo controle. Em contrapartida, este valor foi reduzido na mitocôndria, como observado na figura 16.

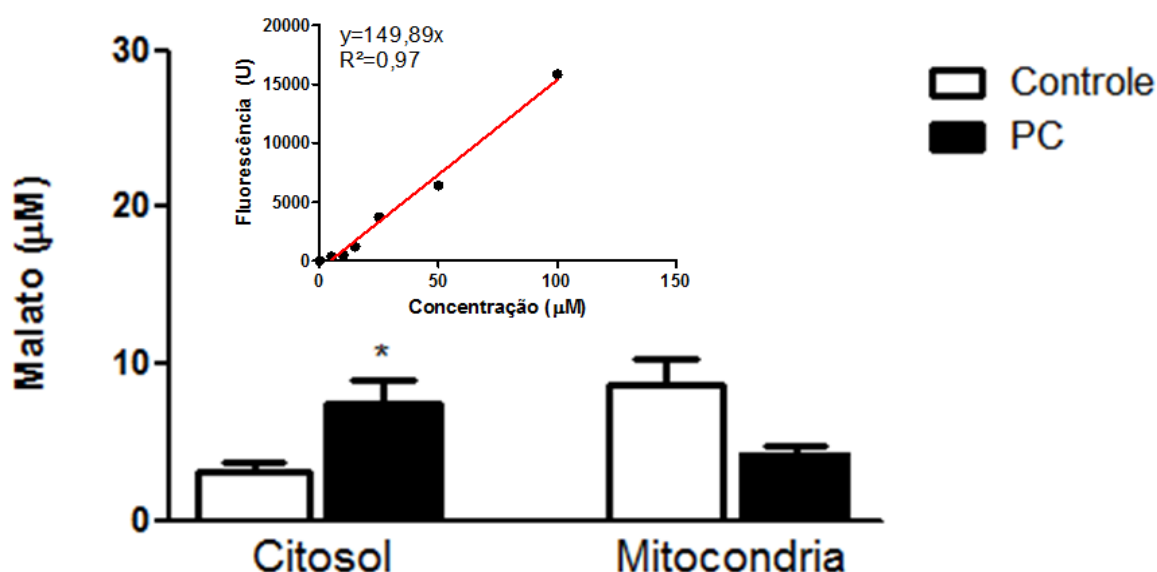


Figura 16. Concentração de malato em µM e sua respectiva curva padrão. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

3.13. Efeito da inibição do transportador de malato na produção de NAD^+ e NADH

Como mostrado anteriormente, nossa hipótese é que a superexpressão de PC leva à saída do malato para o citosol por intermédio da lançadeira de malato. Para confirmar a hipótese e servindo como contraprova, foi realizada a inibição da lançadeira de malato utilizando o ácido butil malônico (10mM/L, pH 7) e, em seguida, mensurado os conteúdos de NAD^+ e NADH . Como esperado, não houve diferença significativa no NAD^+ quando há superexpressão da PC em células C2C12, mas o NADH continuou reduzido, por intermédio de outras vias.

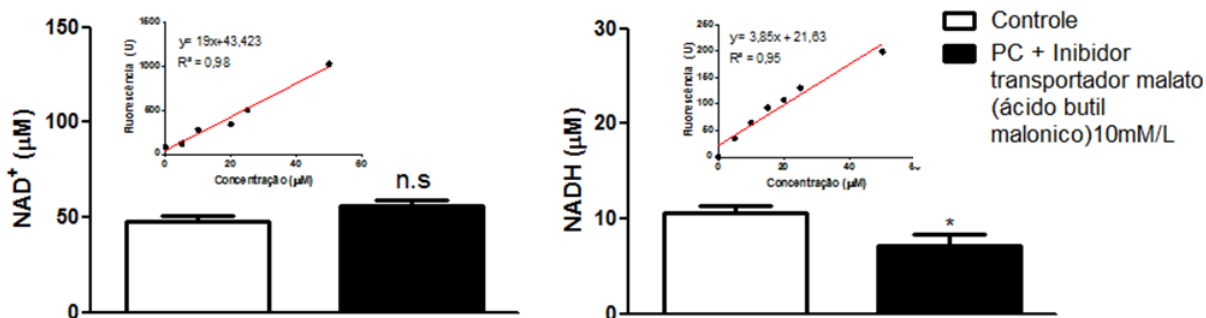


Figura 17. Concentração, em µM, de NAD^+ e NADH em células C2C12 controle, que superexpressam a PC e suas respectivas curvas padrão. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

3.14. Efeito da inibição do transportador de malato na produção de malato na fração citosólica e mitocondrial de células musculares C2C12

Para complementar os resultados, foi realizada a superexpressão da PC na presença e na ausência do inibidor do transportador de malato (ácido butil malônico). Como esperado há aumento na concentração de malato mitocondrial, provando que a superexpressão de PC acumula malato na mitocôndria e a lançadeira possui papel fundamental no fenótipo observado e na cataplerose induzida pela expressão da PC. Nos níveis citosólicos não houve diferença significativa, o que corrobora com a hipótese elaborada, como sugerido pela figura 25.

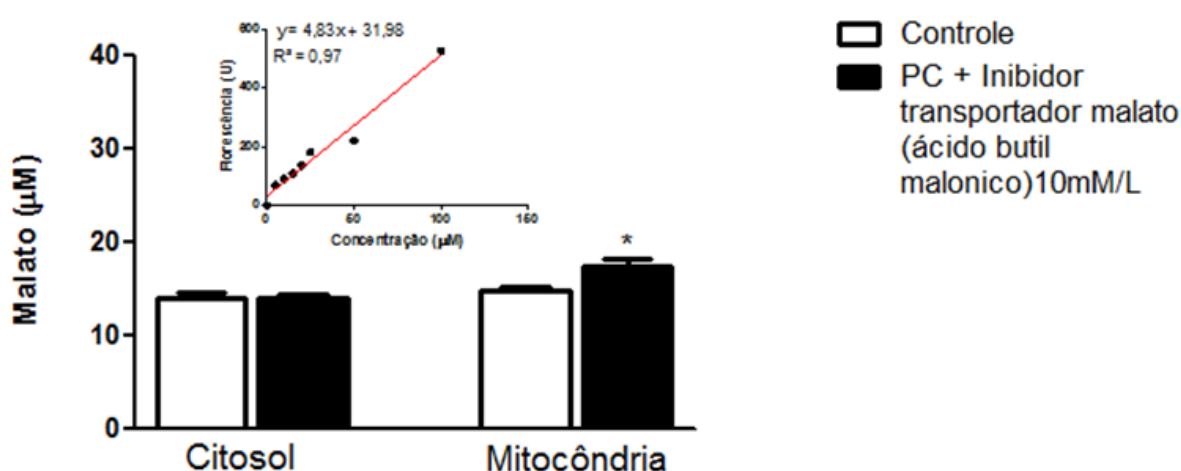


Figura 18. Concentração de malato (μM) em células controle e que superexpressam PC, tratadas com inibidor do transportador de malato e sua respectiva curva padrão. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

3.15. Efeito da superexpressão da enzima piruvato carboxilase na fosforilação de AMPK

Para verificar se o aumento dos conteúdos de NAD^+ com a superexpressão da enzima piruvato carboxilase pode influenciar vias metabólicas como AMPK, foi realizado o experimento de *Western Blotting* para detectar os conteúdos de fosforilação dessa proteína. Observa-se aumento significativo no grupo que superexpressa a enzima PC em relação ao respectivo controle (figura 19). Sabe-se que a AMPK é uma proteína importante na regulação da biogênese mitocondrial e no metabolismo energético intracelular em resposta ao desbalanço energético, principalmente nos conteúdos de NAD^+ e na razão ATP/ADP, motivo pelo qual o exercício físico ativa significativamente a fosforilação desta proteína e o tratamento com algumas drogas também eleva o seu conteúdo, (como por exemplo, o 5-*Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide*, também conhecido como AICAR, potente ativador de AMPK).

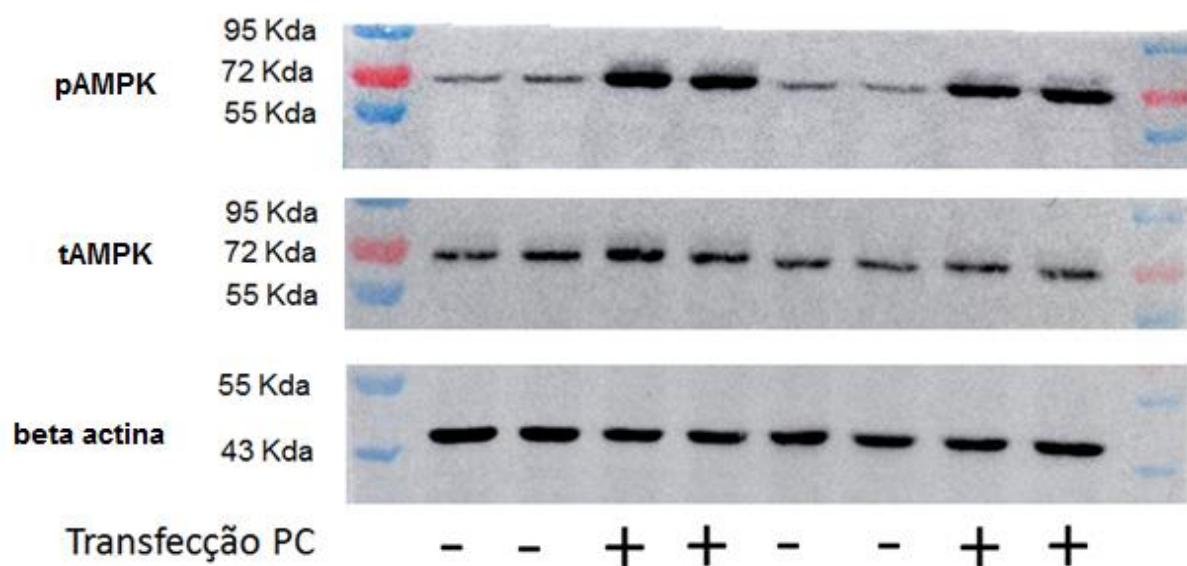


Figura 19. Conteúdo da proteína AMPK total (tAMPK) e fosforilada (pAMPK) e sua respectiva proteína constitutiva β -actina. As células C2C12 foram transfectadas com PC e comparadas ao grupo controle, conforme demonstrado pela figura.

3.16. Efeito da superexpressão da PC no conteúdo da proteína SIRT 3

De acordo com a literatura, o aumento de AMPK e NAD^+ ativam a família das sirtuínas. Como observado na figura 18, a superexpressão da PC tende a aumentar os níveis de SIRT 3 em células C2C12. Devido a inespecificidade do anticorpo, podemos observar tendência de aumento na proteína SIRT 3 quando há superexpressão de PC (figura 20).

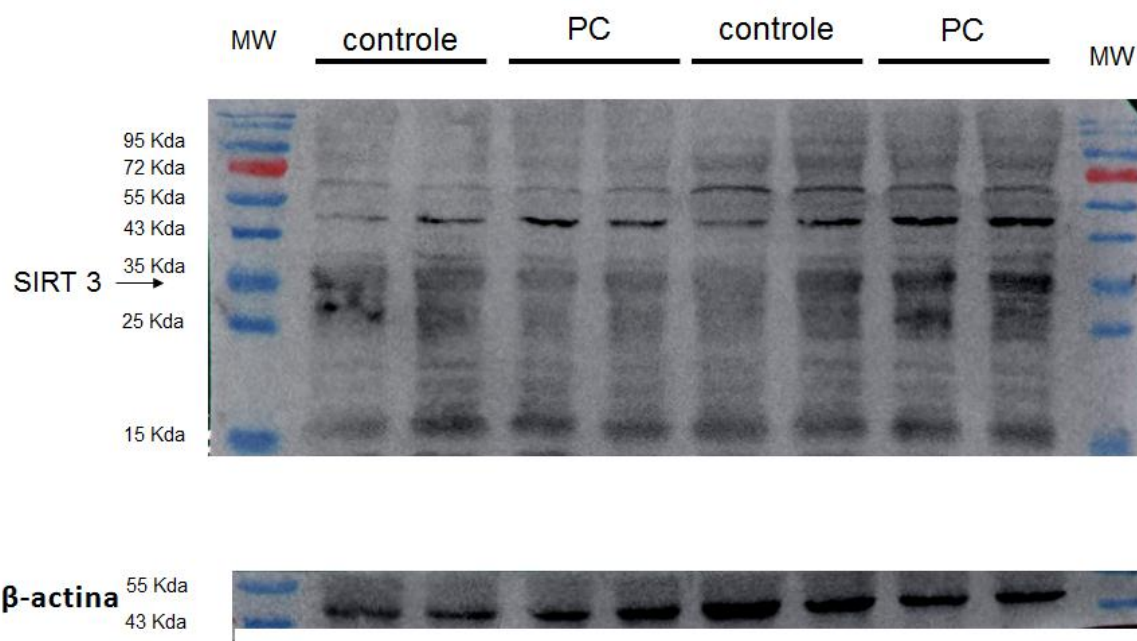


Figura 20. Conteúdo da proteína SIRT 3 (peso molecular 28 Kda) em células controle e tratadas com PC. Como proteína constitutiva, foi usada a β actina.

3.17. Efeito da superexpressão da PC no consumo de oxigênio de células musculares C2C12

Para concluir os efeitos da superexpressão da PC em células musculares C2C12, foi realizado o consumo de oxigênio de células controle e superexpressando a PC por respirometria (*Oroboros Oxygraph-2K*). Como observado, não há diferença significativa no consumo de oxigênio basal, entretanto, ao adicionar o desacoplador CCCP (2 μ M), é possível observar aumento significativo no consumo de oxigênio máximo da mitocôndria em relação ao grupo controle, mostrando que a superexpressão da PC aumenta a função mitocondrial e a capacidade oxidativa. (figura 21).

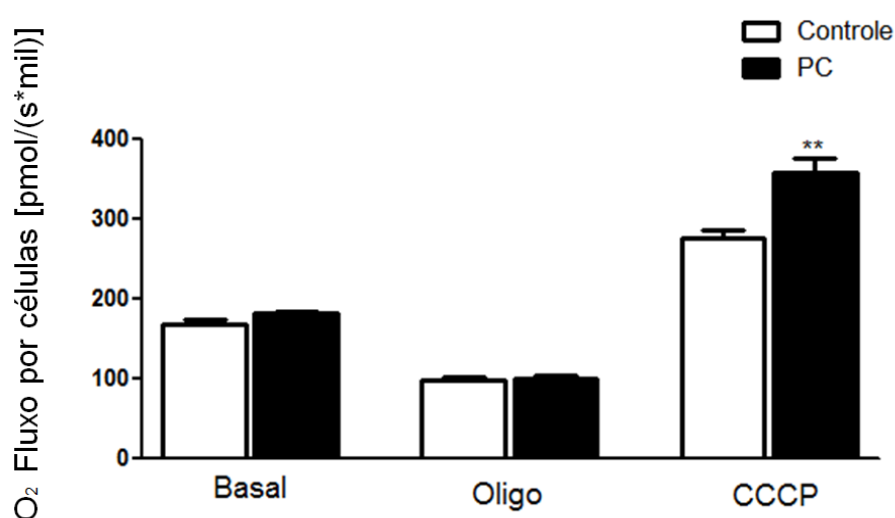


Figura 21. Consumo de oxigênio de células C2C12 controle e que superexpressam PC, na presença do meio de respiração PBS (25 mM de glicose), na presença de oligomicina (2 μ g) e CCCP (2 μ M).

3.18. Tratamento com galactose e *shift* metabólico em células musculares C2C12

Com o aumento dos conteúdos de NAD⁺, captação de glicose, respiração máxima e genes oxidativos, nossa hipótese é que a superexpressão da PC induz *shift* metabólico em células musculares, ou seja, a mudança de metabolismo glicolítico para oxidativo. Para analisar e simular esse fenômeno, as células musculares foram expostas a 10 mM de glicose e 10 mM de galactose. Estudos demonstram que o tratamento com galactose em células musculares induz o *shift* metabólico (GOHIL et. al., 2010). As células tratadas com galactose apresentam fenótipo parecido com a superexpressão da piruvato carboxilase. Como observado na figura 22, o tratamento foi realizado em diversos tempos distintos, avaliando um dos sensíveis parâmetros que temos em nosso laboratório que é a produção de lactato no meio de cultura. Como observado, os tempos mais curtos (2, 4 e 6 horas) apresentaram maior redução

de lactato. A partir deste parâmetro, mensuramos os conteúdos de alguns genes mitocondriais através de PCR em tempo real. Como observado a maioria dos genes apresentam aumento com o tratamento de galactose (figura 23). Por fim, também foi realizado o conteúdo proteico por *western blotting* das proteínas da cadeia transportadora de elétrons (OXPHOS). O tratamento com galactose aumentou significativamente o conteúdo dessas proteínas, mostrando que há aumento da capacidade mitocondrial e metabólica dessas células (figura 24).

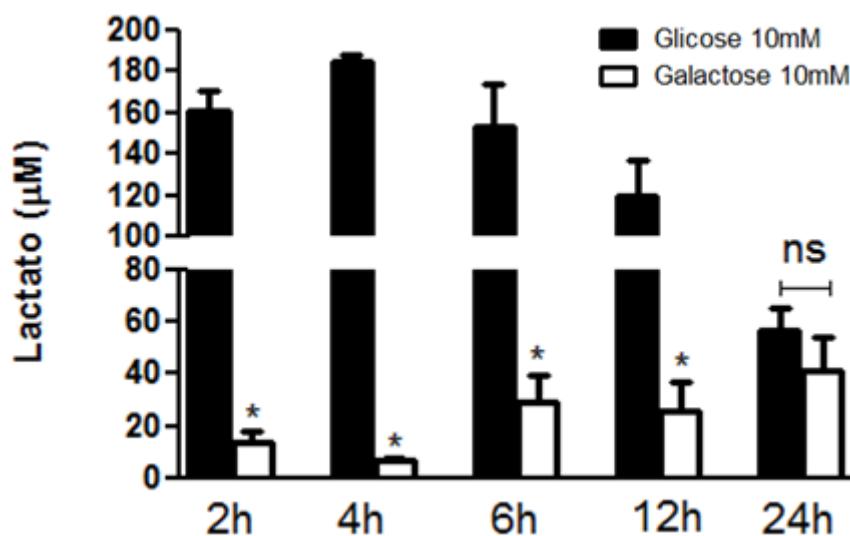


Figura 22. Produção do lactato produzido no meio de cultura em diversos tempos, comparando-se o grupo tratado com glicose e galactose 10 mM, ambos com 4 mM de glutamina presente no meio.

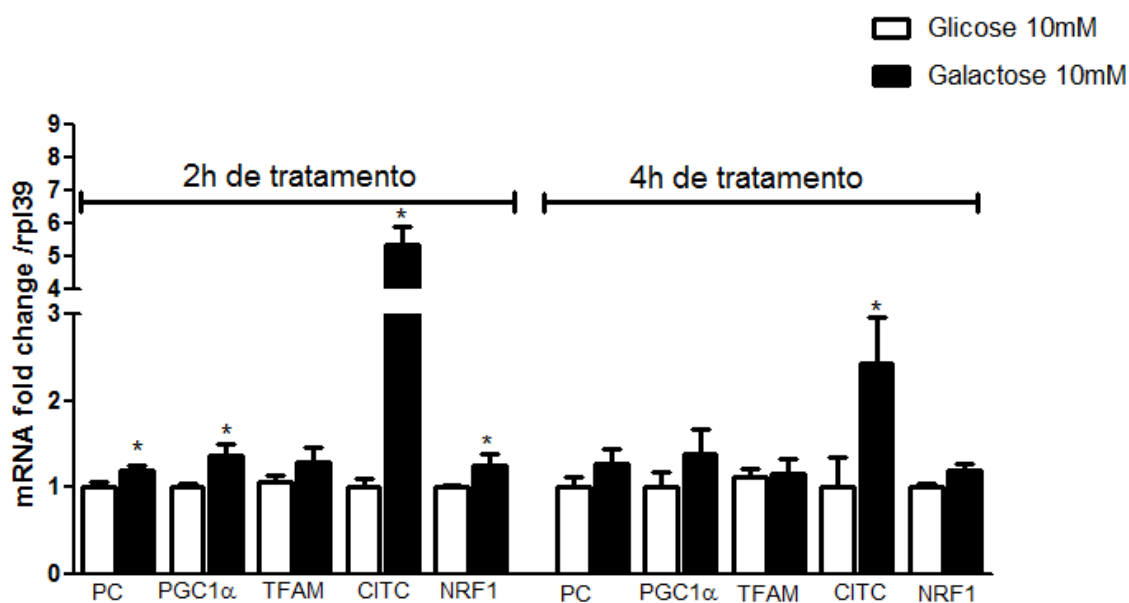


Figura 23. Expressão relativa de genes mitocondriais em grupos controle (tratados com glicose 10 mM) e grupos controle (tratados com galactose 10 mM).

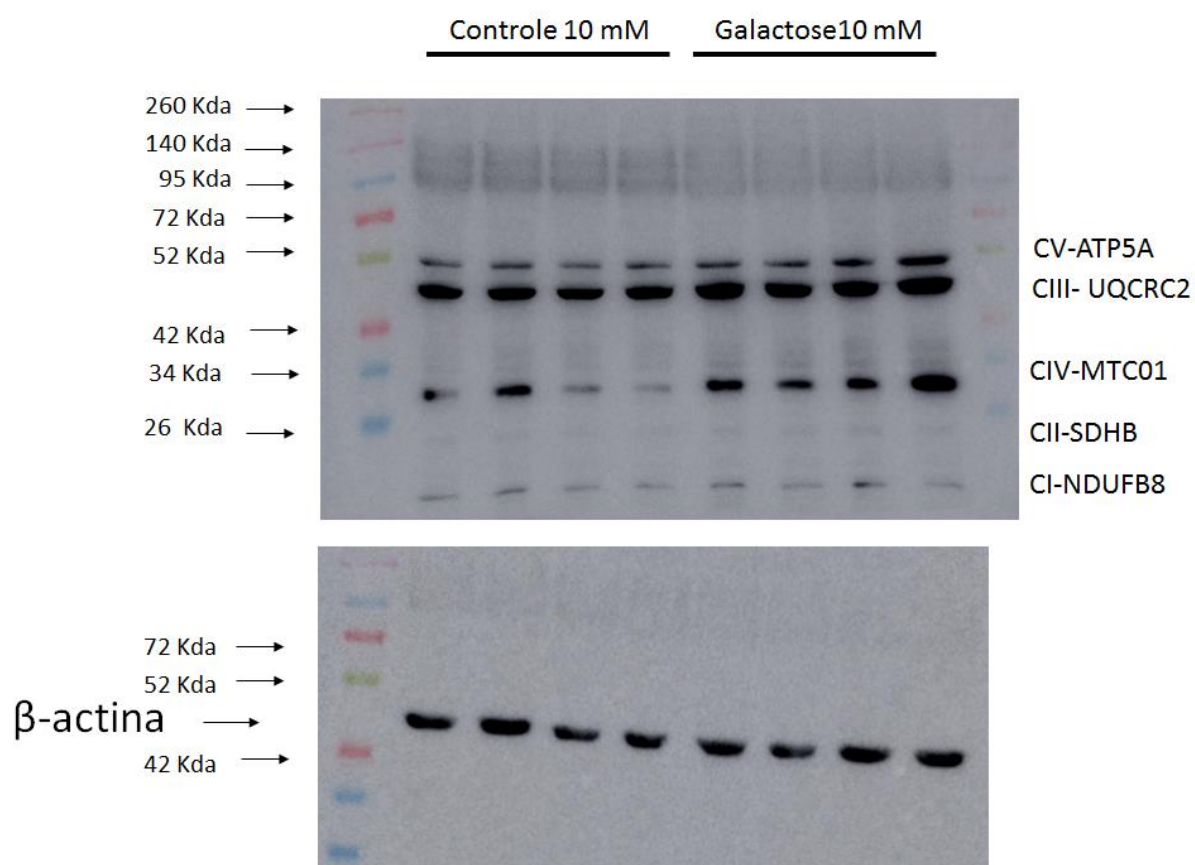


Figura 24. *Western blotting* das proteínas de OXPHOS e sua respectiva beta actina comparando os grupos controle tratados com glicose 10 mM (4 primeiras marcações) e tratados com galactose (4 últimas marcações).

4. DISCUSSÃO

Hanson et al. (2007), já haviam demonstrado que a superexpressão do gene que codifica a enzima anaplerótica, fosfoenol piruvato carboxiquinase (PEPCK), no tecido muscular de camundongos, levou à melhora substancial no fenótipo oxidativo desses animais como demonstrado pelo aumento no metabolismo de lipídeos, aumento no conteúdo de mtDNA e na densidade mitocondrial. Esses animais, quando submetidos a dieta rica em lipídeos por 8 semanas, apresentaram reduzida massa adiposa visceral e subcutânea, mostrando clara resistência contra a obesidade comparados aos animais controles. Mais interessante foi a enorme capacidade de corrida em esteira desses animais comparado aos controles, como demonstrado pelo tempo (4 h vs. 0,25 h) e distância percorrida (5 km vs. 0,2 Km). Embora o mecanismo não tenha sido estabelecido, a reação catalisada pela PEPCK é uma reação muito bem caracterizada no tecido hepático e renal, onde a molécula de oxaloacetato é convertida em fosfoenolpiruvato na reação dependente de GTP sendo, portanto, uma reação eminentemente cataplerótica. Porém, diferentemente do tecido hepático, pois o músculo esquelético, é um tecido que pouco expressa PEPCK e, portanto, não faz gliconeogênese. Neste estudo a indução da expressão dessa enzima contribuiu para aumento na disponibilidade de piruvato para mitocôndria, levando, desse modo, a sugestão de que o controle do processo de anaplerose, pelo menos no tecido muscular, pode ser importante estratégia terapêutica contra a disfunção mitocondrial, como é o caso do diabetes e da resistência à insulina.

Portanto, tomando como base esse aumento claro e acentuado do fenótipo oxidativo desses animais, elaboramos a hipótese de que manipulações em genes responsáveis pela expressão de proteínas anapleróticas, como a piruvato carboxilase (PC), pode melhorar a função mitocondrial, protegendo as células do tecido muscular contra a resistência à insulina, condição já muito bem estabelecida de baixa capacidade mitocondrial.

Como validação da PC como alvo para indução da capacidade mitocondrial em células musculares, fizemos, inicialmente, análise de RNAseq no banco de dados de domínio público em células musculares da linhagem C2C12 não diferenciadas (mioblastos) e diferenciadas (miotubos). Os resultados mostraram que um conjunto de genes associados ao metabolismo mitocondrial e ao programa gênico de controle do processo de biogênese mitocondrial foi várias vezes aumentado, comparado aos mioblastos, indicando aumento claro do fenótipo oxidativo com o processo de diferenciação celular. Nessas mesmas análises, verificamos que a expressão da PC foi aproximadamente 10 vezes aumentada nesses miotubos comparada aos mioblastos, fortalecendo a associação entre função mitocondrial e expressão gênica da PC em células musculares. De fato, quando avaliamos a expressão de PC em tecidos com diferentes

capacidades oxidativas, observamos que tecidos com elevada capacidade mitocondrial, como o tecido adiposo marrom e músculo sóleo de camundongos controles, mostraram aumento na expressão de PC comparado ao tecido adiposo branco e músculo sóleo de animais *ob/ob*. Em adição, células C2C12 expostas ao ácido palmítico mostraram reduzida expressão de PC. Mais interessante, a expressão gênica da PC nesse experimento foi diretamente associada à expressão gênica do co-ativador de biogênese de mitocôndrias PGC1 α .

Na segunda etapa experimental, observamos que células musculares expostas ao ácido palmítico, um reconhecido indutor de disfunção mitocondrial, segundo o qual o seu acúmulo está diretamente associado com a indução de resistência à insulina, reduziu substancialmente a expressão de genes que expressam enzimas anapleróticas incluindo a glutamato desidrogenase (GDH), alanina aminotransferase (AAT) e piruvato carboxilase (PC) como mostrado na figura 2. Por outro lado, células musculares expostas ao AICAR, conhecido ativador de AMPK e de aumento da função mitocondrial, mostraram aumento na expressão dos genes anapleróticos. Esses achados foram consistentes com a redução e aumento nas concentrações dos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico em células expostas ao ácido palmítico ou ao AICAR, respectivamente, sugerindo aumento na demanda energética. Apesar do consumo de oxigênio basal em células musculares C2C12 que superexpressam PC apresentarem apenas a tendência de aumento, é possível observar incremento substancial e significativo quando a célula atinge o nível de respiração máximo estimulado por CCCP (como demonstrado na figura 21). Esses achados são sugestivos que essa proteína pode se constituir de alvos terapêuticos atrativos contra a resistência à ação da insulina no tecido muscular. Porém, considerando a PC uma das mais importantes proteínas anapleróticas para o ciclo do ácido tricarboxílico e sua função na remoção de acetil-CoA mitocondrial (um conhecido metabólito indutor de disfunção mitocondrial), acreditamos que o aumento na sua expressão favorecerá o metabolismo de glicose e ácidos graxos no tecido muscular, protegendo-o da resistência à insulina (KOVES et al., 2008).

É importante observar que o aumento na capacidade mitocondrial imposta pela superexpressão de PC está associado à acentuada expressão de genes importantes do metabolismo de glicose e do processo de biogênese mitocondrial, incluindo PGC1 α , TFAM e SIRT3. Esses achados foram posteriormente observados em células HEK 293T, linhagem celular de fácil manipulação para a transfecção de genes utilizando vetores de expressão. Esse efeito causado pela superexpressão da PC, foi observado também em ilhotas pancreáticas expostas a 2,8 ou 17,6 mM de glicose, na presença ou ausência do inibidor químico da PC, ácido fenil acético (PAA). Como já bem descrito anteriormente, o processo de secreção de insulina é altamente dependente do processo de fosforilação oxidativa mitocondrial. Na

presença do inibidor, observamos redução significativa na secreção de insulina e na expressão de genes mitocondriais associados com o processo de secreção de insulina incluindo o PGC1 α , TFAM e PDX1. Também foi analisada a expressão das enzimas PECPK e PC; observamos maior expressão desses genes, visto que, com a inibição da PC, houve claro prejuízo na secreção de insulina e isto pode ser um dos mecanismos de resposta celular para reestabelecer a função secretória da célula β , provando a importância dessas proteínas no metabolismo oxidativa nessas células. Mais uma vez, esses dados reforçam o conceito de forte associação entre a expressão da enzima PC e da função mitocondrial em diferentes tecidos, incluindo o tecido muscular e pancreático.

Embora ainda conheçamos pouco sobre a associação entre PC e o mecanismo de resposta à insulina, nossos resultados mostraram claramente que o aumento da enzima foi correlacionado com maior resposta à insulina, como demonstrado pelo aumento nos níveis de fosforilação da proteína Akt em células musculares controles e principalmente em células expostas ao ácido palmítico. Como fortalecimento dos nossos resultados, observamos ainda que a superexpressão de PC em células musculares favoreceu o aumento no conteúdo da proteína HIF1 α , um fator de transcrição responsável pelo controle da captação e consumo de glicose em eucariotos. Esse fator em células musculares está relacionado com a sensibilidade à insulina, de acordo com experimentos realizados em nosso laboratório. As observações recentes demonstram que a função mitocondrial é um importante determinante da resposta à insulina em células musculares (Barbosa, M.R et al. 2013), fortalecendo o conceito de que o aumento da expressão gênica de PC contribui para a melhor função mitocondrial.

Outros estudos mostram ainda que, o estresse oxidativo pode ser importante fator determinante na perda da função mitocondrial e da sensibilidade à insulina no tecido muscular (SAVAGE et al., 2007). Embora intrigante em relação ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células com reduzida capacidade respiratória, Koves e colaboradores mostraram que animais diabéticos ou submetidos à dieta hiperlipídica exibem elevada taxa de β -oxidação dos ácidos graxos. Porém, a reduzida taxa na oxidação de glicose é sugestiva de menor atividade do ciclo do ácido tricarboxílico. Dessa forma, é possível especular que a elevada taxa na β -oxidação seguida da reduzida atividade do ciclo do ácido tricarboxílico, favorece o acúmulo de acetil-CoA e seus derivados, os quais são conhecidos inibidores da cascata de sinalização à insulina (Randle et al., 1963). Em experimentos recentes observamos que células musculares expostas ao ácido palmítico exibem precária resposta à insulina. Mais interessantes foram as observações de que a contração muscular, um importante estimulador da função mitocondrial, reduzindo o acúmulo desses intermediários e indicando redução da razão NADH/NAD⁺. Esses resultados indicam, portanto, que a elevada disponibilidade de

lipídio e/ou glicose seguido de baixa atividade do ciclo do ácido tricarboxílico, favorece aumento do estado redox mitocondrial em células musculares diminuindo a respiração. Curiosamente, uma sessão aguda de contração muscular reverteu o quadro de resistência à insulina. A captação de glicose marcada no carbono¹⁴ em cultura de células musculares de ratos previamente tratadas com ácido graxo foi reduzida. Porém, quando submetidas à contração muscular, essas células em cultura mostraram normalização da captação de glicose, exibindo valores da mesma magnitude das células controles (dados não apresentados). Esses achados fortalecem o conceito de que o aumento na atividade anaplerótica mitocondrial constitui-se de importante mecanismo de redução do estresse mitocondrial imposto pela excessiva carga de nutrientes incluindo particularmente os ácidos graxos saturados e o acúmulo mitocondrial de acetil-CoA.

Existem evidências de que o processo de biogênese mitocondrial parece ser regulado pelo aumento na demanda metabólica, estimulando a expressão de genes oxidativos codificados pelo genoma mitocondrial e nuclear, seguido de maior eficiência na produção de energia. Nessas condições, foi observada elevação na expressão dos genes que codificam enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico, incluindo a citrato sintase, isocitrato desidrogenase e α -cetoglutarato desidrogenase, além da piruvato carboxilase (GIBALA et al, 1997). Esse mecanismo foi ainda requerido para a indução de genes associados ao metabolismo de lipídeos favorecendo o conceito de aumento da eficiência na síntese de energia. Mais interessante, a ativação desse processo tem sido demonstrada para melhorar o tempo de vida de leveduras indicando haver clara associação desse mecanismo, como por exemplo, o aumento no gasto calórico e a redução da produção de espécies reativas de oxigênio. Ao contrário, esse mecanismo conhecido atualmente como sinal retrógrado (mitocôndria para o núcleo), é fortemente inibido pelo aumento do estado energético intracelular indicando que a razão ATP/ADP pode ser importante regulador desse processo. De fato, a elevada disponibilidade de energia intracelular tem sido associada a reduzida capacidade mitocondrial, elevado estresse oxidativo e favorecimento na instalação de doenças metabólicas incluindo o diabetes tipo 2. As observações de que mutação do genoma mitocondrial em leveduras (ρ^0 cells) induz aumento dos processos de apoptose e de morte celular nessas células reforçam esse conceito de inibição do sinal retrógrado. Como resposta compensatória, esse defeito metabólico aumenta a transcrição de genes que codificam enzimas glicolíticas. Baseado no conceito de controle do processo de biogênese mitocondrial ou do sinal retrogrado descrito acima, a questão que surge é: como a expressão aumentada de uma enzima anaplerótica poderia induzir aumento do processo de biogênese e, conseqüentemente, aumento da função mitocondrial?

Hanson & Hakimi (2008) sugeriram que o mecanismo por trás das mudanças fenotípicas do animal com a superexpressão da enzima PEPCK, pudesse estar associado ao aumento do processo de cataplerose mitocondrial, via transporte de malato mitocondrial para o citosol na reação dependente de NADH com consequente elevação de NAD^+ citosólico. Nessas condições, a célula muscular aumente sua demanda por substratos energéticos para suprir a remoção constante dos intermediários oxaloacetato/malato do ciclo do ácido tricarboxílico.

Recentemente, Cardaci et. al (2015) demonstraram, em células renais de camundongo com o silenciamento do gene da enzima succinato desidrogenase (SDHb), que a falta dessa enzima levou ao maior consumo do piruvato extracelular, indicando aumento acentuado do consumo de glicose. Mais interessante, esse aumento foi dependente da elevação na expressão do gene da piruvato carboxilase (PCX) desviando o fluxo de glicose para a via de síntese de aspartato, importante via para a síntese; não somente de proteínas, mas também de pirimidinas e purinas e nucleotídeos. Similarmente, em células musculares expostas ao ácido palmítico, observamos reduzida atividade do ciclo do ácido tricarboxílico, ao passo que a superexpressão de PCX nessas células foi capaz de protegê-las de reduzida atividade do ciclo do ácido tricarboxílico, reduzida função mitocondrial e da resistência à insulina, sugerindo que o aumento de PCX possa ter tido efeito similar àqueles observados em células renais com silenciamento da SDHb. Em adição, o *shift* metabólico induzido pela elevada expressão de PCX, como destacado pela redução significativa de lactato no meio de cultura, pode ter contribuído para aumento na indução do processo de biogênese mitocondrial, como indicado pela elevação no consumo de oxigênio, na expressão de genes mitocondriais e no conteúdo de mitocôndrias.

Com base nesses achados, estamos sugerindo que a superexpressão da enzima piruvato carboxilase promove aumento de oxaloacetato (convertido de piruvato) e provocando desequilíbrio na reação catalisada pela enzima malato desidrogenase, induzindo aumento significativo no conteúdo de malato no ciclo de Krebs. O resultado de acúmulo de malato na mitocôndria faz com que este saia para o citosol, através da lançadeira de malato, e, no citosol, esse malato é reconvertido em piruvato. O desbalanço mitocondrial de intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico induz a anaplerose como mecanismo de compensação da saída do intermediário, como demonstrado na figura 16. Sabe-se ainda que a PC é uma enzima que utiliza como substrato o ATP em sua conversão de piruvato a oxaloacetato, portanto sua expressão pode levar uma redução da razão ATP/ADP, promovendo alteração no fenótipo metabólico da célula, induzindo maior biogênese mitocondrial, respiração e capacidade oxidativa. Em adição, a conversão de oxaloacetato em malato reduz os níveis de NADH

mitocondrial, aumentando, portanto, a fosforilação oxidativa e a capacidade mitocondrial de células musculares C2C12 (figura 25).

É importante ressaltar que uma das características conhecidas em indivíduos diabéticos e animais resistentes à insulina ou tratados com dieta hiperlipídica é o acúmulo de acetil-coA mitocondrial. Esse acúmulo é um dos responsáveis por desencadear a disfunção metabólica, aumento de espécies reativas de oxigênio e inflamação celular. Com o mecanismo proposto, a redução de NADH e de ATP mitocondriais pode favorecer a conversão dessa molécula e, assim, ser um mecanismo de proteção da instalação da resistência à insulina.

Como observado em nossos experimentos, a superexpressão da PC promoveu aumento de NAD⁺ mitocondrial e redução da razão NADH/NAD. Essa diminuição foi acompanhada de acentuada fosforilação de AMPK e ativação de SIRT3, que é uma proteína sensível ao NAD⁺ no músculo esquelético. Nossa hipótese é que, com a diminuição do NADH mitocondrial, a célula possua razão ATP/ADP reduzida, o que poderia ser um dos fatores de ativação da AMPK. A AMPK ativa promove a fosforilação do PGC1 α que, juntamente com a deacetilação induzida por SIRT, migra para o núcleo e inicia a transcrição de vários genes mitocondriais. Esses genes expressos aumentam a capacidade mitocondrial, como demonstrado pelo aumento do consumo de oxigênio e da expressão de genes associados a sua função, formando assim uma sinalização entre mitocôndria e núcleo, fenômeno denominado de sinalização retrógrada. (Figura 26).

5. CONCLUSÕES

A elevada disponibilidade de nutrientes (ácido palmítico) promove resistência à insulina, diminuindo a atividade anaplerótica mitocondrial no tecido muscular como indicado pelos resultados de mRNA das enzimas GDH, PC e GPT. Porém, o aumento no conteúdo dessas proteínas através do tratamento com mimético de AMPK (AICAR) indica que essas podem ser importantes alvos terapêuticos para o tratamento de doenças metabólicas, como por exemplo, a resistência à insulina induzida pelos ácidos graxos em células musculares isoladas. Embora o mecanismo ainda não esteja claramente evidenciado, a enzima PC participa desse processo como indicado pelo efeito da sua superexpressão, causando *shift* metabólico (desvio do metabolismo de glicose para o oxidativo), induzindo na expressão de genes do programa gênico mitocondrial (biogênese), aumento de cataplerose do malato e transporte de NADH mitocondrial para o citosol. Esse quadro é reproduzido quando as células musculares C2C12 são tratadas com galactose, causando desvio metabólico. Portanto, estamos propondo que a elevada expressão de PC exibe forte associação com a atividade mitocondrial, favorecendo a captação de glicose e a resposta à insulina, indicando que o controle da expressão da PC pode constituir-se de estratégia importante de proteção contra a resistência à insulina no tecido muscular, abrindo novas perspectivas terapêuticas no controle do diabetes tipo 2.

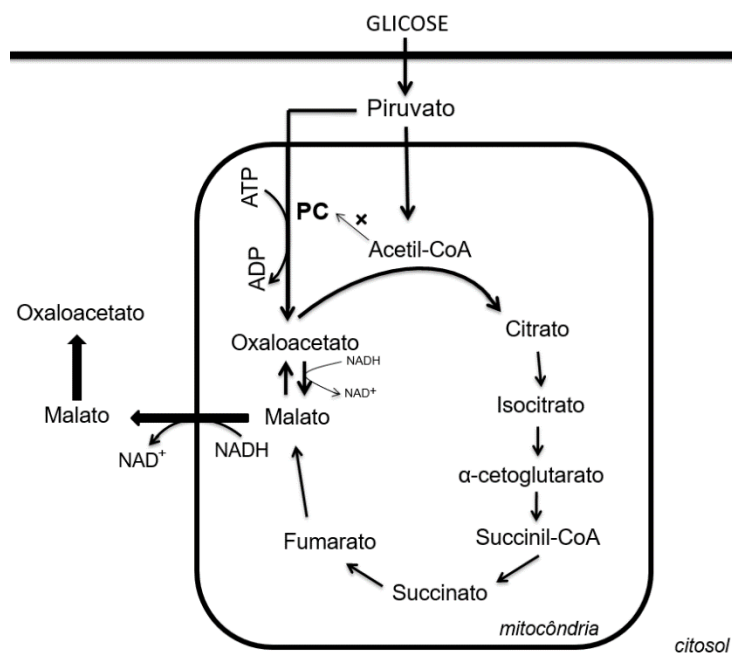


Figura 25. Possível mecanismo de indução de *shift* metabólico e aumento de NAD⁺ mitocondrial, por intermédio do acúmulo de oxaloacetato, sua conversão para malato e a saída deste da mitocôndria, via transportador de malato.

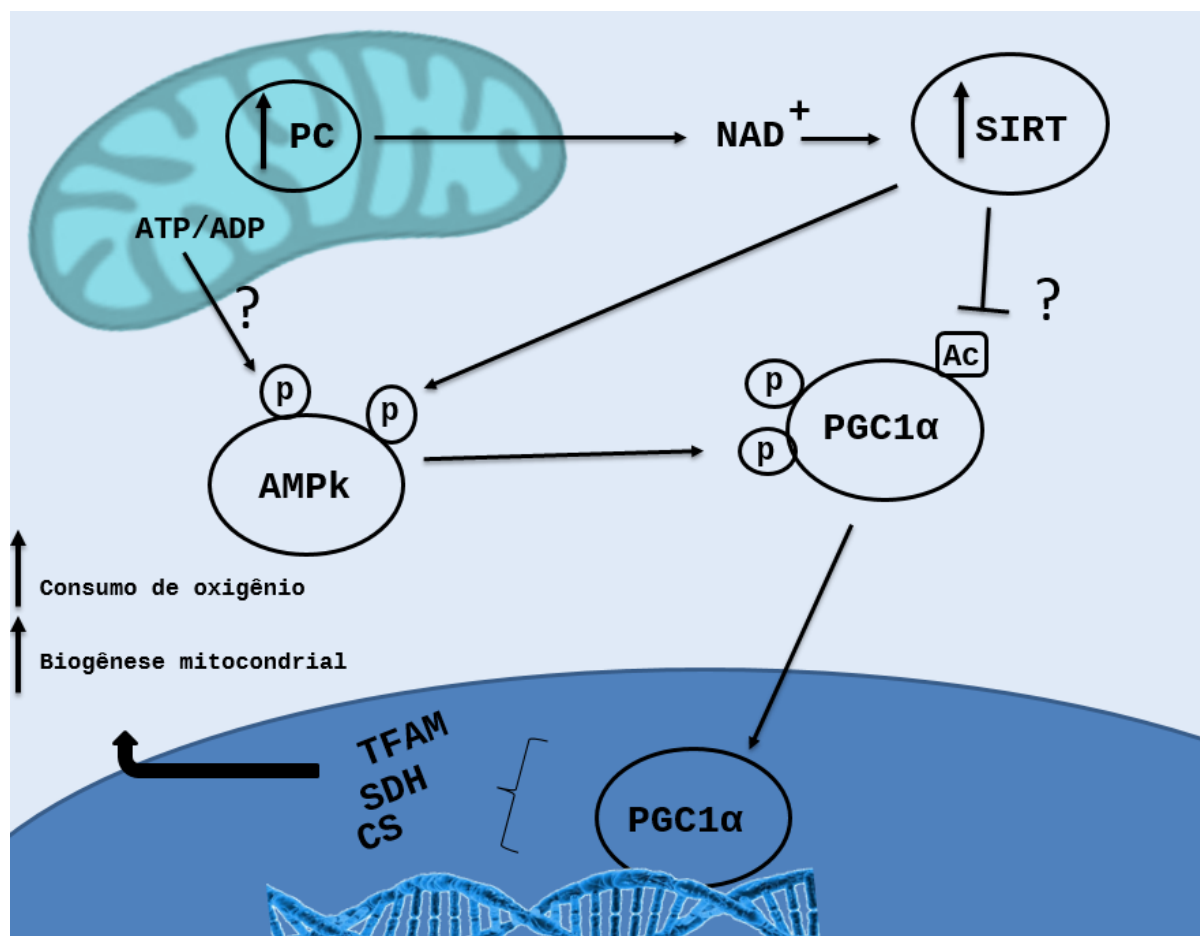


Figura 26. Sinalização retrógrada: comunicação entre mitocôndria e núcleo induzida pela superexpressão da enzima piruvato carboxilase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S. et al. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, United States, v. 124, n. 4, p. 783-801, 2006.

BANGSBO, A. et al. Tricarboxylic acid cycle intermediates accumulate at the onset of intense exercise in man but are not essential for the increase in muscle oxygen uptake. **Pflugers Archives**, Rockville , v.06, p. 52- 58, 2006.

BARBOSA, M.R et al. Hydrogen peroxide production regulates the mitochondrial function in insulin resistant muscle cells : effect of catalase overexpression. **Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, New york, v. 1832, p1591-1604, 2013.

BERGMEYER, H.U. Methods of Enzymatic analysis. **New York: Academic**, United States, ed. 2, p. 120-301, 1974.

BOMFIM, L.H.M. Efeito da expressão da enzima piruvato carboxylase no metabolismo, na função mitocondrial e na resposta à insulina em células musculares. Escola de educação física e Esporte (EEFERP) – Ribeirão Preto, 2014.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, United States, v. 72, p. 248–254, 1976.

CARDACI, S. et al, Pyruvate carboxylation enables growth of SDH-deficient cells by supporting aspartate biosynthesis. **Nature cell biology**, United States, p.1317, 2015.

CARL, L.; JERROLD, O. Inflammation and insulin resistance. **FEBS Letters**, Canada, v.97, p.92-102, 2008.

CHALKLEY, S.M. et al. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult mice. **American Journal of physiology, endocrinology and Metabolism**, United States, v.282, p. 1231-1238, 2002.

ELIAS C.B, et al. Improving glucose and glutamine metabolism of human HEK 293 and trichoplusia ni insect cells engineered to express a cytosolic pyruvate carboxylase enzyme. **Biotechnology progress**, p.263, 2010.

FEBBRAIO, A.; LANCASTER, G.I. The immunomodulating role of exercise in metabolic diseases. **Cell Metabolism**, United States, v.35, p. 262-269, 2014.

GIBALA. M.J. et al. An acute decrease in TCA intermediates does not affect aerobic metabolism delivery in contracting rat skeletal muscle, United States, **American Journal of Physiology**, v.13, p.703, 1997.

GIBALA, M.J. et al. Short-term training attenuates muscle TCA cycle expansion during exercise in women. **Journal of applied physiology**, United States, v.95, p.999- 1004, 2003.

GOHIL, V.M. et al. Nutrient-sensitized screening for drugs that shift energy metabolism from mitochondrial respiration to glycolysis. **Nature Biotechnology**, United States, v.28, p. 249 – 255, 2010.

DAWSON, K.D. et al. Short-term training attenuates muscle TCA cycle expansion during exercise in women. **Journal of Applied Physiology**, United States, v.95, p.999-1004, 2003.

HABER, E.P. et al. Palmitate modulates the early steps of insulin signaling pathway in pancreatic islets. **FEBS letter**, Germany, v.8, p.185, 2003.

HAKIMI, P. et al. Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse. **Journal of Biological Chemistry**, Ohio, 2007.

HANSSON, O. et al. Transcriptome and proteome analysis of soleus muscle of hormone-sensitive lipase-null mice. **Journal of Lipid Research**, Cleveland, v. 46, n.12, p. 2614–2623, 2005.

HANSON, R.W. et al. Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse. **The journal of biological chemistry**, Cleveland, v.282, n. 45, p. 32844-32855, 2007.

HÉLÈNE D. et al. Ver-erb- α modulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. **Nature**, United States, v.19, 1039-1046, 2003.

HIRABARA, S. et al. Time-dependent effects of fatty acids on skeletal muscle metabolism. **Journal of Cellular Physiology**, United States, v. 210, n. 1, p. 7-15, 2007.

HISSIN, P.J.; HILF, R. A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Deduced Dlutathione in Tissues. **Analytical Biochemistry**, United States v. 74, p, 214-226, 1976.

HOLLOSZY, J.O. Exercise-induced increase in muscle insulin sensitivity. **Journal Applied of Physiology**, United States, v. 99, p. 338-343, 2005.

KELLEY, D.E. et al. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. **Diabetes**, United States, v. 52, n. 10, p. 2944–2950, 2002.

KOVES, T.R. et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance, **Cell Metabolism**, United States, v.7, p.45-56, 2008.

KLINGENBERG, M. et al. The reconstituted isolated uncoupling protein is a membrane potential-driven H⁺ translocator. **Journal of Endocrino Biology**, United States v.4, p. 3087–3092, 1985.

KOVES, R.T. et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. **Cell Metabolism**, United States, v. 7, p. 45-56, 2008.

KORNBERG, H.L. et al. In Essay in Biochemistry, **Academic Press**, London, v.31, p.1-31, 1966.

LOH, K. et al. Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity. **Cell Metabolism**, United States, v. 10, n. 4, p. 260-272, 2009.

MICHAEL, L.F. et al. Restoration of insulin-sensitive glucose transporter (GLUT4) gene expression in muscle cells by the transcriptional coactivator PGC-1. **Proceedings of The National Academy Sciences of United States of American**, Unites States, v. 98, n. 7, p. 3820-3825, 2001.

MUIO, D.M. et al. Mechanisms of disease: molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and beta-cell failure in type 2 diabetes. **Nature reviews molecular and cell biology**, United States, p.193.

NEWSHOLME, E.A. et al. Biochemistry for Medical Sciences. **Biochemistry Journal**, Toronto,v.03 p. 623-27, 1983.

PEDRO, M. Q. et al. Mitonuclear communication in homeostasis and stress. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, United States, v.17, p. 213-226, 2016.

PETERSEN, K. F. et al. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance, **Science**, New York, v.300, n. 5622, p. 1140-1142, 2003.

RANDLE, P.J. et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v.1 , n. 7285, p. 785-789, 1963.

REID, M.B. et al. Reactive oxygen in skeletal muscle: Intracellular oxidant kinetics and fatigue in vitro. **Journal Applied of Physiology**, Unites States, v. 73, n. 5, p. 1805–1809, 1992.

RODEN, M. et al. Non-invasive studies of glycogen metabolism in human skeletal muscle using nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Current Opinion in Clinical Nutrition & metabolic Care**, New York, v.4, p.261-266, 2001.

RODEN, M. et al. The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. **Nature**, United States, v.8, p.92-103, 2011.

SABIN, M.A et al. Fatty acid-induced defects in insulin signaling in myotubes derived from children, are related to ceramide production from palmitate rather than the accumulation of intramyocellular lipid. **Journal of cell physiology**, p.244-52, 2007.

SAHLIN, K. et al. Phosphorylase activities at different exercise power output, United States, **American journal of physiology**, v.83, p.259, 1990.

SANDSTRÖM, M.E. et al. Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, United States, v. 575, n. Pt , p. 251-262, 2006.

SHULMAN, G.I. et al. Increased substrate oxidation and mitochondrial uncoupling in skeletal muscle of endurance-trained individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, United States, v. 105, p. 16701-16707, 2008.

SAVAGE, D.B.; PETERSEN, K.F.; SHULMAN, G.I. Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance. **Physiological Reviews**, Canada, v. 87, n. 2, p. 507-520, 2007.

SHARMA et al. Secretin differentially sensitizes rat pancreatic acini to the effects of supramaximal stimulation with caerulein, **Journal of Physiology**, United States, v.16, p.562, 2005.

SILVEIRA, L.R. et al. The contraction induced increase in gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha), mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP3) and hexokinase II (HKII) in primary rat skeletal muscle cells is dependent on reactive oxygen species. **Biochemistry et Biophysica ata**, United States v. 1763, n. 9, p. 969-976, 2006.

SILVEIRA, L.R. et al. Updating the effects of fatty acids on skeletal muscle. **Journal of Cellular Physiology**, United States, v. 217, n. 1, p. 1-12, 2008.

SPRIET, L.L et al. Regulation of skeletal muscle fat oxidation during exercise in humans. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, United States, v. 34, n. 9, p. 1477–1484, 2002.

TAEGETMAYER, H. et al. Utilization of energy-providing substrates in the isolated working rat heart, **Biochemistry Journal**, Canada, v.82, p.183-186, 1980.

TOWBIN, et al, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, **PNAS**, USA, 1979.

YU, C. et al. Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, United States, v. 277, n. 52, p. 50230–50236, 2002.

ZHENG, L. et al. Pyruvate carboxylation enables growth of SHD-deficient cells by supporting aspartate biosynthesis. **Nature cell biology**, p.17, 2015.

Anexo I. Comitê de ética do projeto



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **EFEITO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA PIRUVATO CARBOXILASE NO METABOLISMO, NA FUNÇÃO MITOCONDRIAL E NA RESPOSTA À INSULINA EM CÉLULAS MUSCULARES**, registrada com o nº **4375-1**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Leonardo Reis Silveira e Lucas Henrique Montes Bomfim**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **19 de outubro de 2016**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	10/03/2015-31/03/2017
Vigência da autorização para manipulação animal:	19/10/2015-31/03/2017
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J
No. de animais:	12
Peso / Idade:	30 dias / 15g
Sexo:	machos
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 19 de outubro de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

Anexo II. Declaração direitos autorais**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **EFEITO DA EXPRESSÃO DA ENZIMA PIRUVATO CARBOXILASE NO METABOLISMO, NA FUNÇÃO MITOCONDRIAL E NA RESPOSTA À INSULINA EM CÉLULAS MUSCULARES**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 27 de março de 2017

Assinatura :



Nome do(a) autor(a): **Lucas Henrique Montes Bomfim**

RG n.º 48917002x

Assinatura :



Nome do(a) orientador(a): **Leonardo dos Reis Silveira**

RG n.º 5654810